URSACHEN DES VERLANGSAMTEN BIOLOGISCHEN ABBAUS HALOGENIERTER AROMATISCHER KOHLENWASSERSTOFFE: MODELLUNTERSUCHUNGEN AN SUBSTITUIERTEN BENZOATEN UND 3,5-CYCLOHEXADIEN-1,2-DIOL-1-CARBONSÄUREN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt
von
WALTER REINEKE
aus Lemgo

Göttingen 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534923_0008

URSACHEN DES VERLANGSAMTEN BIOLOGISCHEN ABBAUS HALOGENIERTER AROMATISCHER KOHLENWASSERSTOFFE: MODELLUNTERSUCHUNGEN AN SUBSTITUIERTEN BENZOATEN UND 3,5-CYCLOHEXADIEN-1,2-DIOL-1-CARBONSÄUREN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt
von
WALTER REINEKE
aus Lemgo

Göttingen 1976

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. H.-J. Knackmuss
Korreferent: Prof. Dr. H. G. Schlegel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.2.1976

Für U.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
EINLEITUNG		1
METHODEN		4
CHEMIKALIEN		24
EXPERIMENTE und ERGEBNISSE		26
1.	Wachstumsversuche mit Pseudomonas Stamm B 13	26
2.	Isolierung von 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktase negativen Mutanten von Pseudomonas Stamm B 13	32
2.1.	Mutationsauslösung	32
2.2.	Ausarbeitung einer Methode zur Anreicherung	34
2.2.1.	Bestimmung der Empfindlichkeit von Pseudomonas Stamm B 13 gegenüber Antibiotika	34
2.2.2.	Abtötung wachsender und ruhender Zellen durch Antibiotika	35
2.3.	Selektion von Mutanten des β-Ketoadipinsäure-Weges	38
2.4.	Charakteristika der Mutante Pseudomonas Stamm B 13/27 B	39
3.	"Doppelhydroxylierung" von Benzoat	4o
3.1.	Bestimmung von Substituenteneinflüssen auf die Oxygenierung von Benzoat	41
3.1.1.	Benzoat-Dioxygenase in Pseudomonas Stamm B 13	42
3.1.2.	Benzoat-Dioxygenase in Pseudomonas putida (arvilla) mt2	45

Seite

3.2. Analyse der Oxygenierungsprodukte beim Umsatz meta-substituierter Benzoate 47

4. Dehydrierung von 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure 5o

4.1. Anreicherung der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktasen aus Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas Stamm B 13 51

4.2. Eigenschaften der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktasen 58

4.2.1. pH-Optimum des Enzymes aus Pseudomonas Stamm B 13 58

4.2.2. Bestimmung des K_m-Wertes für NAD^+ des Enzymes aus Pseudomonas Stamm B 13 59

4.2.3. Bestimmung von Substituenteneinflüssen auf die Dehydrierung von 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure 6o

4.2.3.1. Affinität der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktasen zu substituierten Substraten 6o

4.2.3.2. Messung der maximalen Umsatzgeschwindigkeiten substituierter 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren 62

4.3. Konformationsanalyse der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren 64

5. Präparation substituierter 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure 66

6. Eigenschaften der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren 67

6.1. Chromatographische Eigenschaften 67

6.2. NMR-Spektren 69

Seite

6.3. Zuordnung der 3- und 5-Substitutionsisomeren der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren 72

6.4. UV-Spektren 73

6.5. Schmelzpunkte der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren 77

6.6. Circular-Dichroismus der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren 78

6.7. Massenspektren der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren 82

6.8. Molekülpeaks unter Hochauflösung 86

6.9. IR-Spektren der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren 87

6.1o. Zur Stereochemie der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren 89

6.1o.1. Bildung des Acetonides der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure 89

6.1o.2. IR-Spektren der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren in verdünnter Lösung in Tetrachlorkohlenstoff 9o

DISKUSSION 91

1. Einflüsse von Substituenten auf die Oxygenierung von Benzoat 91

2. Einflüsse von Substituenten auf den Umsatz von 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure 1oo

3. Stereochemie der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure 1o3

4. Möglichkeiten der Verwertung neuer Substrate 1o8

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	112
LITERATURVERZEICHNIS	115
ANHANG	126
NMR-Spektren	126
UV-Spektren und Circular-Dichroismus	133
Massenspektren	138
IR-Spektren	143

Abkürzungen

Bzt	Benzoat
Cat	Brenzcatechin
CD	Circular-Dichroismus
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diäthylaminoäthyl
DDT	Di-(p-chlorphenyl)-β-trichloräthan
DHB	Dihydro-dihydroxybenzoat (Trivialname für (-)-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
HPLC	High pressure liquid chromatography
IR	Infrarot
MS	Massen
NAD(H_2)	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
NB	Nutrient broth
NMG	1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin
NMR	Nuclear magnetic resonance
PCB	Polychloriertes Biphenyl
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

EINLEITUNG

Die zunehmende Produktivität der chemischen Industrie läßt die Zahl und die Mengen von synthetischen organischen Chemikalien stetig anwachsen. Trotz der enormen Strukturvielfalt werden die meisten Allelochemikalien durch Mikroorganismen vollständig mineralisiert. Es überrascht nicht, daß gewisse Xenobiotika dem raschen biologischen Abbau widerstehen bzw. sie so langsam abgebaut werden, daß es zur unerwünschten Akkumulation in der Umwelt kommt. Neben physikalischen Faktoren wie z.B. hohe Polarität, großes Molekulargewicht oder geringe Wasserlöslichkeit (WODZINSKI und JOHNSON, 1968; WODZINSKI und COYLE, 1974) müssen auch chemische für die "unerwünschte Persistenz" (KORTE und KLEIN, 1971) verantwortlich sein, zumal sich bei gewissen akkumulierten Verbindungen gemeinsame chemische Strukturelemente erkennen lassen.

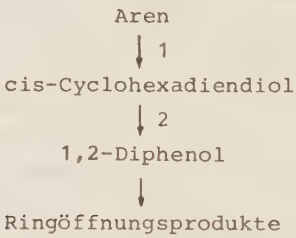
Eine bezüglich Langlebigkeit besonders spektakuläre Stoffklasse ist die der chlorierten aromatischen Kohlenwasserstoffe. Obwohl in einer Vielzahl von Arbeiten (CATELANI et al., 1971; 1973; CATELANI und COLOMBI, 1974; FOCHT und ALEXANDER, 197o; LUNT und EVANS, 197o; OHMORI et al., 1973) der Metabolismus von Biphenyl und Diphenylmethan beschrieben wurde, zählen die chlorierten Analoga PCB und DDT zu den persistentesten niedermolekularen Umweltchemikalien. Die Ursache der Persistenz ist nicht im Strukturgerüst, sondern im Strukturelement der C-Cl-Bindung am Aromaten oder dem Chlorsubstituenten selbst zu vermuten.

Da chlorsubstituierte aromatische Kohlenwasserstoffe eine Rarität unter den Naturstoffen darstellen - die wenigen Beispiele sind von DOONAN (1973) zusammengestellt - ist die Fähigkeit zur Spaltung der "unphysiologischen" C-Cl-Bindung am aromatischen Kern nur selten bei Bakterien anzutreffen. Es sind jedoch Bakterien bekannt, welche aromatische Verbindungen mit niederem Halogenierungsgrad als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle

verwerten, wobei der Halogensubstituent auf einer späteren, nicht-aromatischen Stufe des Abbauweges eliminiert wird (HARPER und BLAKLEY, 1971). Voraussetzung für den Totalabbau chlorierter aromatischer Verbindungen ist der cometabolische Umsatz durch die gewöhnlichen Enzyme des Aromatenabbaus bis zu einer nicht-aromatischen Stufe, wo Halogenid, entsprechend der leichteren nucleofugen Verdrängbarkeit des Substituenten, eliminiert werden kann.

Wie die Akkumulation der chlorierten Verbindungen zeigt, müssen die cometabolischen Umsetzungen durch die gewöhnlichen Enzyme des Aromatenabbaus langsam ablaufen. Es stellt sich die Frage, ob alle enzymatischen Schritte durch Halogensubstituenten gleichmäßig stark verlangsamt werden oder ob es besonders kritische Abbauschritte gibt.

Im allgemeinen werden nicht-phenolische Aromaten mittels Dioxygenasen durch Einführung von Hydroxylsauerstoff aktiviert. Die entstehenden cis-Cyclohexadiendiole unterliegen dann als 1,2-Diphenole der Ringöffnung und dem Totalabbau.



Ein Substituent wie Chlor wirkt aufgrund seiner gegenüber Kohlenstoff viel größeren Elektronegativität der Aktivierung des Aromaten entgegen. Es sollten also die einleitenden Dioxygenase-Reaktionen besonders stark verlangsamt und in diesem Reaktionsschritt ein die Persistenz verursachendes Moment verborgen sein.

Auf der Grundlage dieser Hypothese sollte in der vorliegenden

Arbeit an zwei den Aromatenabbau einleitenden Reaktionen (1 und 2) der Einfluß von Halogensubstituenten auf den Umsatz studiert werden. Als Modellsubstrate boten sich Benzoat und die halogenierten Analoga dank ihrer guten Wasserlöslichkeit an. So entfiel ein zusätzlicher Faktor, der die Analyse der Substituenteneinflüsse erschwert hätte, wie er bei anderen Arenen wie Benzol oder Naphthalin auftreten muß.

METHODEN

1. Organismen

Der überwiegende Teil der Untersuchungen wurde mit Pseudomonas Stamm B 13 (DORN et al., 1974) und der von diesem Stamm abgeleiteten Mutante B 13/27 B durchgeführt.

G.D. Hegeman, Department of Microbiology, Indiana University, stellte uns die Mutante B 9 von Alcaligenes eutrophus 335 (ATCC 17697) zur Verfügung.

Der Wildtyp Alcaligenes eutrophus (Hydrogenomonas eutropha) stammte von Frau Dr. Wilde, Institut für Mikrobiologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, Göttingen.

Pseudomonas putida (arvilla) mt2 erhielten wir von P.A. Williams, Department of Biochemistry and Soil Science, University College of North Wales, Bangor.

2. Nährlösungen

Alcaligenes eutrophus 335 B 9 wurde mit dem Medium nach JOHNSON und STANIER (1971) unter Verwendung der Spurenelementlösung nach PFENNIG und LIPPERT (1966), aber ohne EDTA und $FeSO_4$, angezogen.

Für die Anzucht von Pseudomonas Stamm B 13, Stamm B 13/27 B, Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas putida (arvilla) mt2 wurde die bei DORN et al. (1974) beschriebene Nährlösung verwendet. Als Kohlenstoffquellen dienten Benzoat, 3-Chlorbenzoat, 3-Methylbenzoat oder Dinatriumsuccinat bis zu einer Konzentration von 1o mM.

Für feste Nährböden wurde den Medien 2% Agar zugesetzt. Der Nutrient Broth-Agar setzte sich aus o,8% Nutrient Broth, o,5% Natriumchlorid und 2,o% Agar zusammen.

3. Anzucht

Kleine Zellmengen wurden in 1l- bzw. 2l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit 1oo ml oder 5oo ml Medium angezogen. Die Kolben wurden bei 28°C auf einem Rotationsschüttler (Typ RC 1o6, Finfors AG, Basel) mit 15o upm inkubiert.

Die Anzucht von größeren Zellmengen erfolgte in 5l- oder 1ol-Fermentern (Biostat, Fa. B. Braun, Melsungen), die 3l bzw. 8l Medium enthielten. Die Kulturen wurden mit 5l bzw. 8l pro Minute belüftet. Die Temperatur wurde bei 3o°C gehalten. Die Fermenter wurden mit 6oo upm gerührt.

Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase mit Hilfe einer Zeta 2o Zentrifuge (Fa. Heraeus-Christ, Osterode / Harz) abgeerntet. Je nach Verwendung und Empfindlichkeit der Zellen wurden diese bei verschiedenen Temperaturen zentrifugiert, mit geeigneten Puffern gewaschen und darin resuspendiert.

Für Versuche mit Extrakten wurden die Zellen von Pseudomonas Stamm B 13 und Alcaligenes eutrophus bei 4°C zentrifugiert, einmal mit Tris/HCl-Puffer, pH 8,o, gewaschen und im gleichen Puffer zu einer optischen Dichte von 2oo (E_{546nm}) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei -2o°C eingefroren.

Pseudomonas Stamm B 13 und Pseudomonas putida (arvilla) mt2 wurden für Versuche mit ganzen Zellen jeweils frisch angezogen, bei 2o°C zentrifugiert, einmal mit 5o mM Phosphat-Puffer, pH 7,4, gewaschen und zu einer Dichte von 2o-3o (E_{546nm}) im gleichen Puffer aufgenommen.

Der Succinat gezogenen Kultur der Mutante Alcaligenes eutropus 335 B 9 wurde in der späten exponentiellen Wachstumsphase Benzoat bis 2 mM zugesetzt. Nach 4-stündiger Inkubation wurden die Zellen bei 4°C abzentrifugiert, einmal mit 5o mM Phosphat-Puffer, pH 6,8, gewaschen und so resuspendiert, daß sich eine Suspension mit der Dichte 2oo (E_{546nm}) ergab. Diese wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Mutante Pseudomonas Stamm B 13/27 B wurde auf Succinat im 5l-Fermenter angezogen. In der späten exponentiellen Wachstumsphase wurde die Bakteriensuspension steril in zwei 6l-Zweihalskolben abgefüllt und dann mit 2 mM Benzoat bzw. 3-Chlorbenzoat unter magnetischer Rührung bei 3o°C 15 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden bei 2o°C abzentrifugiert, einmal mit 5o mM Phosphat-Puffer, pH 7,4, gewaschen und zu einer Dichte von 1oo (E_{546nm}) resuspendiert. Da die Zellen ohne beträchtlichen Aktivitätsverlust nicht gelagert werden konnten, wurden nur frisch angezogene zur Messung der Affinitätsspezifität der Benzoat-Dioxygenase verwendet.

4. Aufbewahrung und Reinheitskontrollen

Die Stammkulturen wurden bei 2o°C aufbewahrt und einmal im Monat überimpft.

Pseudomonas putida (arvilla) mt2 wurde auf 3-Methylbenzoat kultiviert, da bei Kultivierung auf Benzoat sehr schnell ein spontaner Verlust des Toluat-Plasmides eintritt (WILLIAMS und MURRAY, persönliche Mitteilung)

Pseudomonas Stamm B 13 wurde auf 3-Chlorbenzoat, Alcaligenes eutrophus auf Benzoat gehalten. Die beiden Mutanten Alcaligenes eutrophus 335 B 9 und Pseudomonas Stamm B 13/27 B wurden auf NB-Agar überimpft und so aufbewahrt.

Die Reinheit der Kulturen wurde durch Ausstreichen auf Komplexagar und durch Mikroskopie überprüft. Die Mutanten wurden auf Benzoat- bzw. 3-Chlorbenzoat-Verwertung hin untersucht.

5. Messung des Bakterienwachstums

Je nach Fragestellung wurde das Wachstum mit verschiedenen Methoden bestimmt.

5.1. Zelldichte

Die optische Dichte einer Zellsuspension wurde mit einem Photometer PL4, Fa. Zeiss, Oberkochem, bei 546 nm und einer Schichtdicke von 1cm bestimmt. Die Proben wurden verdünnt, wenn die Extinktion den Wert o,3 überstieg.

5.2. Gesamtzellzahl

Die Zellzahl wurde unter Verwendung einer Zählkammer nach Neubauer (Fa. W. Schreck, Hofheim/Ts.) ermittelt.

5.3. Lebendzellzahl

Die Zahl der zur Koloniebildung befähigten Zellen wurde durch Ausplattieren von geeigneten Verdünnungen auf NB-Platten bestimmt.

6. Colorimetrische Chloridbestimmung nach BERGMANN und SANIK (1957)

Zu 2o ml Chlorid-Lösung in einem 25 ml Gefäß wurden 2 ml einer o,25 M Eisenammoniumsulfat-Lösung in 9 M Salpetersäure pipettiert. Danach wurden 2 ml einer gesättigten Lösung von Quecksilberthiocyanat in Äthanol hinzugefügt und gut gemischt. 1o min nachdem sich die Farbe entwickelt hatte, wurde bei 46o nm in Küvetten mit 5 cm Lichtweg gemessen. Da in der Luft enthaltene Chloride langsam absorbiert wurden, mußten die Messungen so schnell wie möglich durchgeführt werden. Aus dem

gleichen Grund wurde gegen Wasser in der Referenzküvette gemessen.

Die Eichkurve wurde mit einer Standard-Natriumchlorid-Lösung im Bereich o - 1oo γ aufgenommen.

7. Mutationsauslösung

Vom Schrägagar wurden 3o ml Minimal-Medium mit 1o mM 3-Chlorbenzoat als Substrat im 5oo ml - Erlenmeyerkolben mit Schikanen beimpft und 24 Stunden bei 3o°C geschüttelt. Die Kultur erreichte in dieser Zeit die späte exponentielle Wachstumsphase mit einer Extinktion von ungefähr 1 - 1,2.

7.1. Behandlung wachsender Zellen mit NMG

Mit 7 ml einer solchen Kultur der späten exponentiellen Wachstumsphase wurden 3o ml Minimal-Medium mit 1o mM 3-Chlorbenzoat beimpft und bei 3o °C inkubiert. Nach 3 - 4 Stunden wurde eine Extinktion von o,45 erreicht, was einem Titer von 3 x $1o^8$ Zellen/ml entsprach. Zu 1 ml der obigen Kultur wurden o,1 - o,2 ml einer o,1 proz. NMG-Lösung, entsprechend einer Endkonzentration von 3o - 6o µg/ml, gegeben und mit Phosphat-Puffer auf 3 ml aufgefüllt. Der pH wurde zwischen 6,4 - 7,4 variiert. Die Zellsuspension wurde ohne Schütteln bei 3o °C inkubiert.

7.2. UV-Bestrahlung

Eine Kultur der späten exponentiellen Wachstumsphase wurde so verdünnt, daß sie eine Extinktion von o,55 hatte. Mit einer UV-Lampe (Fa. Original Hanau) wurden 6 ml dieser Suspension in einer Petrischale (Ø 8,5 cm) bestrahlt. Dabei wurde die Petrischale auf einer Plattierhilfe gedreht.

7.3. Behandlung mit salpetriger Säure

Zellen aus der stationären Wachstumsphase mit einer Extinktion von 1,75, entsprechend 2×10^9 Zellen / ml, wurden abzentrifugiert und so in o,9 proz. Natriumchlorid-Lösung aufgenommen, daß die Suspension einen Titer von 10^9 Zellen / ml hatte. Zu 1 ml dieser Suspension wurden jeweils 1 ml o,6 N Acetat / NaOH-Puffer, pH 4,5, und o,o5 M $NaNO_2$-Lösung hinzugefügt.

Zu verschiedenen Zeiten wurden den Inkubationsgemischen Proben entnommen und o,1 ml geeigneter Verdünnungen auf NB-Agar ausplattiert. Nach 24 Stunden bildeten die überlebenden Zellen gut zählbare Kolonien.

Bei direkter Isolierung von Mutanten ohne Anreicherungsschritt wurden o,1 ml geeigneter Verdünnung auf Platten mit 5 mM 3-Chlorbenzoat und einer wachstumslimitierenden Konzentration von 1 mM Succinat plattiert.

8. Anreicherung von Mutanten

Nach der Mutationsauslösung wurden 1 ml der Inkubationsgemische in 3o ml Minimal-Medium mit 5 mM Succinat übergeimpft und 4o Stunden bei $30^{\circ}C$ geschüttelt. Der ausgewachsenen, verarmten Kultur wurden 3-Chlorbenzoat, Endkonzentration 5 mM, und Salze zugesetzt. Nach 8 Stunden, in denen nur die Wildtyp-Zellen wuchsen, wurden von dieser Kultur 2,5 ml Zellsuspension in einen Ansatz mit 1o ml Endvolumen mit Penicillin G behandelt. Der Ansatz enthielt 2ooo E / ml Penicillin G, 2o% Saccharose und einen Zelltiter von 2×10^8 Zellen / ml. Nach 1o Stunden wurde die Abtötung der Zellen durch Verdünnen abgestoppt. Auf Platten mit 5 mM 3-Chlorbenzoat und einer wachstumslimitierenden Konzentration von 1 mM Succinat wurden o,1 ml einer geeigneten Verdünnung ausplattiert.

9. Isolierung von Mutanten

Nach dreitägiger Inkubation bei 30°C wurden die kleinsten Kolonien mit einer Impfnadel auf NB-Platten übergeimpft. Nach 24 Stunden wurden die Kolonien mittels Samtstempel auf Platten mit Benzoat, 3-Chlorbenzoat sowie 4-Hydroxybenzoat als Kohlenstoff- und Energiequelle übertragen.

Die Kolonien, die weder auf Benzoat noch 3-Chlorbenzoat, aber auf 4-Hydroxybenzoat wuchsen, wurden auf NB-Platten überimpft und aufbewahrt.

Von den auf NB-Agar kultivierten Mutanten wurden jeweils 2,5 ml Minimal-Medium mit 10 mM Succinat und 2 mM 3-Chlorbenzoat im Reagenzglas beimpft und 24 Stunden in Schräglage auf einem Rollbebrüter (Fa. Nägele, Frankfurt am Main) inkubiert. Die ausgewachsenen Kulturen wurden mit einer Mikro-Hämatokrit-Zentrifuge (Fa. Heraeus-Christ, Osterode / Harz) abzentrifugiert und das jeweils Überstehende mit einem Rotationsverdampfer (Fa. Büchi, Schweiz) bis auf wenige Tropfen eingeengt. Diese Lösungen wurden mit dem Fließmittelgemisch A (s.S. 20) auf Kieselgel-DC-Fertigplatten chromatographiert und die aufgetrennten Ausscheidungsprodukte mittels Referenzsubstanzen zugeordnet.

10. Herstellung zellfreier Extrakte

Zur Bereitung eines zellfreien Extraktes wurden die bei -20°C gelagerten Zellen aufgetaut. Nach Zusatz von DNase wurde die Suspension in eine auf 0°C vorgekühlte Frenchpresse (Aminco, Silver Spring, USA) gegeben und zweimal mit einem Druck von 800 kp / cm^2 aufgeschlossen.

11. Proteinbestimmungen

11.1. Proteinbestimmung zellfreier Extrakte

Die Proteinkonzentration in Extrakten wurde mit der Biuret-Methode nach BEISENHERZ et al. (1953) bestimmt.

11.2. Proteinbestimmung von ganzen Zellen

Die Proteinbestimmung wurde nach der von SCHMIDT et al. (1963) modifizierten Methode von LA RIVIERE (1958) durchgeführt.

12. Bestimmung von Enzymaktivitäten

12.1. Messung der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktase-Aktivität

Die Messung wurde mit einem Zeiss PL4 Spektralphotometer in 1 ml Glasküvetten mit 1o mm Lichtweg durchgeführt. Die Extinktionsänderung während der Reaktion wurde mit einem Kompensationsschreiber (Fa. Servogor) aufgezeichnet.

Die 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktase-Aktivität (DHB-Dehydrogenase) wurde als DHB-abhängige $NADH_2$-Bildung gemessen (REINER, 1972). Die Reaktion fand bei 2o°C statt, wenn o,o1 - 2 mg Enzym in die Küvette pipettiert wurden, die 2o µmole Tris / HCl, pH 8,o (A. eutrophus) bzw. pH 8,4 (Pseudomonas Stamm B 13), o,4 µmole Substrat (DHB oder substituierte DHB) und 2,o µmole NAD^+ in einem Volumen von 1 ml enthielt. Der Anstieg der Absorption wurde bei 365 nm gemessen.

Die spezifische Aktivität wurde im Bereich linearer Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Extraktmenge ermittelt.

Eine Enzymeinheit entspricht der Aktivität, die die Bildung von 1 µmol $NADH_2$ pro Minute unter den angegebenen Bedingungen katalysiert.

12.2. Bestimmung der Benzoat-Dioxygenase-Aktivität in ganzen Zellen

Zur Bestimmung der Aktivität wurde die Abnahme des Substrates verfolgt. Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase, wie oben beschrieben geerntet, wurden mit Benzoat bzw. den substituierten Analoga bei 3o°C in 1oo ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen inkubiert. Die Kolben wurden in einem modifizierten Rundwarburg (Fa. B. Braun, Melsungen) mit einer Frequenz von 14o / min und einer Amplitude von 7,5 cm geschüttelt und so die Ansätze ausreichend belüftet. Die Zellsuspension, welche je nach Substrat eine Dichte von 2 - 15 (E_{546nm}) hatte, enthielt in 15 ml 5o mM Phosphat-Puffer, pH 7,4, 3o µmole Substrat.

Nach 1, 2, 4, 6, 9, 12, 16, 2o und 25 min wurden o,5 ml eines jeden Ansatzes entnommen und in Plastik-Zentrifugenröhrchen für die Mikro-Hämatokrit-Zentrifuge (Fa. Heraeus-Christ, Osterode / Harz) abgefüllt. Durch Abkühlen der Röhrchen in flüssigem Stickstoff wurde die Reaktion abgestoppt. Die eingefrorenen Proben wurden im Eis aufbewahrt und anschließend 6 min in der Mikro-Hämatokrit-Zentrifuge zentrifugiert. Durch die Erwärmung des Rotors tauten die Proben während der Zentrifugation auf, so daß die Zellen sedimentieren konnten. Von jedem Überstehenden wurden 5 µl mit Hilfe der HPLC an der Umkehrphase (Gerätebeschreibung sowie weitere Daten s.S. 2o - 22) aufgetrennt. Das Eluat wurde mittels UV-Detektor bei fester Wellenlänge (254 nm) analysiert und die Peak-Flächen von einem Integrator ausgemessen.

Die Aktivität wurde ermittelt, indem die anfängliche Substratabnahmerate auf den vollständigen Umsatz extrapoliert wurde. Eine Einheit entspricht der Aktivität, die 1 µmol Substrat pro Minute umsetzt.

12.3. Bestimmung der Catechol-1,2-Oxygenase-Aktivität

Die Aktivität wurde nach SISTRON und STANIER (1954) bestimmt, indem die Extinktionszunahme bei 260 nm mit einem Zeiss DMR 10 Spektralphotometer bei 20°C verfolgt wurde.

Ein Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml: 100 µmole Tris / HCl, pH 8,0, 10 µmole 2-Mercaptoäthanol, 1 µmol Brenzcatechin bzw. substituierte Analoga und 0,01 - 0,1 ml Enzymlösung entsprechend 0,01 - 2 mg Protein.

Unter diesen Bedingungen waren die Reaktionsraten linear und proportional der Enzymkonzentration. Eine Enzymeinheit ist die Menge Enzym, welche die Bildung von 1 µmol cis,cis-Muconsäure bzw. ihrer substituierten Analoga pro Minute katalysiert.

13. Bestimmung der Affinitätsspezifität der Benzoat-Dioxygenase an ganzen Zellen

Mit Hilfe von Mutanten, die in der DHB-Dehydrogenase defekt sind, läßt sich zeigen (KNACKMUSS und REINEKE, 1973), daß aus meta-substituierten Benzoaten jeweils zwei isomere DHB mit Substituenten in 3- und 5-Stellung gebildet werden. Das Isomerenverhältnis gibt Auskunft über die Stereospezifität der Benzoat-Dioxygenase.

Die mit Benzoat bzw. 3-Chlorbenzoat induzierten Mutantenzellen von Pseudomonas Stamm B 13 / 27 B wurden mit 2 mM 3-Fluor-, 3-Chlor-, 3-Brom- und 3-Methylbenzoat bei 30°C auf einem Rundschüttler inkubiert. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden Proben entnommen und mit der Mikro-Hämatokrit-Zentrifuge die Zellen abgetrennt. Mit Hilfe der HPLC wurden jeweils 1 µl der zellfreien Reaktionslösungen chromatographiert. Die Elutionspeaks wurden mittels authentischer Vergleichspräparate bestimmten Isomeren zugeordnet und ihre Mengenverhältnisse unter Berücksichtigung der molaren Extinktionskoeffizienten bei 254 nm ermittelt.

14. Enzymatische Zuordnung der meta-substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Isomeren

Aufgrund der verschiedenen relativen Aktivitäten der "normalen" Pyrocatechase für 3- und 4-substituierte Brenzcatechine kann zwischen 3- und 5-substituierten DHB unterschieden werden, nachdem diese enzymatisch zu den entsprechenden Brenzcatechinen umgewandelt sind.

Die Umwandlung wurde nach Angaben von DORN (1976) wie folgt durchgeführt:
Es wurden nacheinander o,25 ml NAD^+ (2mM), o,5 ml DHB-Dehydrogenase (1mg/ml, Präparat aus Alcaligenes eutrophus, Pyrocatechase-frei), o,8 ml Pyruvat (2omM), o,4 ml Lactat-Dehydrogenase (2mg/ml), 2,o5 ml Tris/HCl (pH 8,o, 2o mM mit 3,3 mM 2-Mercaptoäthanol) und 1 ml Substratlösung (1mM) pipettiert. Nach 4 Stunden Inkubationsdauer, die ausreichte, um alles Substrat in das jeweilige Brenzcatechin umzuwandeln, wurde mit 2,4 ml des Reaktionsansatzes mit gereinigter Pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B 13 die relative, auf Brenzcatechin bezogene Aktivität nach SISTRON und STANIER (1954), wie oben beschrieben, bestimmt.

15. Anreicherung der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktasen aus Pseudomonas Stamm B 13 und Alcaligenes eutrophus

Sämtliche im folgenden beschriebenen Anreicherungsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei $4^{\circ}C$ durchgeführt.

15.1. Rohextrakt

Die mit der Frenchpresse aufgebrochenen Zellen wurden 15 min bei 1o.ooo g zentrifugiert und so ganze Zellen und größere Zelltrümmer abgetrennt. Das Überstehende bildete den Rohextrakt.

15.2. 1oo.ooo g - Fraktion

Der Rohextrakt wurde 9o min bei 1oo.ooo g zentrifugiert. Das Überstehende war die 1oo.ooo g - Fraktion, das Sediment wurde verworfen.

15.3. Ammoniumsulfat-Fällung

Unter magnetischer Rührung wurde den Extrakten aus Pseudomonas Stamm B 13 Ammoniumsulfat bis zu einer 2o%igen Sättigung zugesetzt. Der Niederschlag wurde nach 3o min durch Zentrifugation (2o min, 2o.ooo g) sedimentiert und verworfen. Das Überstehende wurde auf 6o% Ammoniumsulfat-Sättigung gebracht. Das gefällte Protein wurde abzentrifugiert, anschließend in Tris / HCl-Puffer, pH 8,o, aufgenommen und über Nacht gegen 1o l des gleichen Puffers dialysiert.

Entsprechend wurde vom Extrakt aus Alcaligenes eutrophus die Fraktion von o - 4o%iger Ammoniumsulfat-Sättigung hergestellt.

15.4. Trennung an DEAE-Cellulose

Die gegen Tris / HCl-Puffer (o,o2 M, pH 8,o) äquilibrierte DEAE-Cellulose wurde in eine Säule (Ø 2,5 cm X 6o cm, Füllhöhe 45 cm) eingeschlemmt. Die konzentrierte Proteinlösung wurde auf diese Säule aufgetragen und nach dem Eindringen in das Austauschermaterial mit 2oo ml des oben aufgeführten Puffers gewaschen. Unter Verwendung eines linearen NaCl-Gradienten (o - o,5 M in o,o2 M Tris / HCl-Puffer, pH 8,o) wurde das Enzym von der Säule eluiert. Mit Hilfe eines Radi Rac Fraktionssammlers (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurden Fraktionen von 8 - 1o ml aufgefangen. (Durchflußrate 16 - 2o ml / Std.). Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereinigt und mittels Ammoniumsulfat-Fällung konzentriert. Der Extrakt wurde über Nacht gegen 5 l Tris/HCl-Puffer (o,o2 M, pH 8,o) dialysiert.

15.5. Chromatographie an Sephadex G-2oo

Der konzentrierte Extrakt wurde an einem gegen Tris / HCl-Puffer (o,o2 M, pH 8,o) äquilibrierten Gel (Säulenabmessungen Ø 2,6 X 1oo cm, Füllhöhe 8o cm) chromatographiert. Es wurden Fraktionen von 2 - 3 ml aufgefangen. Die Durchflußrate betrug 2 - 3 ml / Std.. Diejenigen Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereinigt. Durch Ammoniumsulfat-Fällung und anschließende Dialyse wurde der Extrakt konzentriert.

16. Herstellung von substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren und ihren Derivaten

16.1. Umsatz von substituierten Benzoaten

Beim Umsatz substituierter Benzoate durch die Mutante Alcaligenes eutrophus 335 B 9 werden entsprechend substituierte 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren an das Medium abgegeben.

Die Cooxydation von Benzoat (Bzt), 2-F-, 3-F-, 4-F-, 3-Cl-, 3-Br- und 3-CH_3-Bzt wurde mit 1,5 g Naßgewicht Zellen / l Kulturflüssigkeit im 5l-Fermenter (Fa. B. Braun, Melsungen) in 5o mM Phosphat-Puffer, pH 6,8, durchgeführt. Die Suspension wurde mit 7 l / min belüftet und mit 6oo upm umgewälzt. Die Zellen konnten 1 - 2 Wochen im Kühlschrank ohne großen Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Es wurden portionsweise 6 - 8 mmole Substrat zugesetzt, wobei die ständige Konzentration in der Kulturflüssigkeit 1 mM nicht überschritt. Der Umsatz wurde mittels Dünnschicht- oder Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie verfolgt und durch Zentrifugation der Suspension beendet, nachdem alles Substrat umgesetzt war.

Schwer umsetzbare Substrate wie 4-Cl-, 3,5-diCl- und 4-CH_3-Bzt wurden in 5oo ml Phosphat-Puffer (5o mM, pH 6,8) in 2l-Erlen-

meyerkolben mit Schikanen bei 3o°C unter magnetischer Rührung inkubiert. Es wurden nur o,2 - 1,o mmole in 24 Stunden von 8,5 g Naßgewicht Zellen umgesetzt.

16.2. Extraktion der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Die Kulturflüssigkeiten wurden mittels Rotationsverdampfer (Fa. Büchi, Schweiz) i.V. bei 35°C auf etwa 1/2o - 1/4o des ursprünglichen Volumens eingeengt. Die konzentrierten Lösungen wurden mit konzentrierter Salzsäure auf pH 2 angesäuert, dabei wurde die Temperatur durch ein Eiskochsalzbad bei o °C gehalten. Die angesäuerten wäßrigen Lösungen wurden möglichst rasch mit dem 5o-fachen Volumen Äthylacetat quantitativ extrahiert. Durch Zugabe von Eisstückchen wurde die Temperatur bei o°C gehalten. Die vereinigten Äthylacetat-Lösungen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und bei 2o°C i.V. auf etwa 1o - 2o ml eingeengt.

16.3. Isolierung der Natriumsalze der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Die Natriumsalze von 2-F-, 4-F-, 3,5-diCl-, 4-Cl- und 4-CH_3-DHB, die nicht im Gemisch mit Isomeren entstehen, konnten direkt aus dem Äthylacetatextrakt dargestellt werden.

Die Äthylacetat-Lösungen der freien Säuren wurden bis zur Trockne eingeengt. Die kristallin anfallenden, instabilen freien Säuren wurden in wenig Wasser aufgenommen und mit Natronlauge neutralisiert. Die Natriumsalze kristallisierten bei Zugabe von Äthanol bzw. Propanol-2 (2-F-DHB) aus. Sie wurden mit Äthanol gewaschen und bei 3o °C i.V. über Phosphorpentoxid getrocknet.

16.4. Darstellung der Methylester

Die unter 16.2. gewonnenen konzentrierten Äthylacetatextrakte

wurden im Kolben unter Schwenken mit so viel ätherischer-äthanolischer Diazomethan-Lösung (DE BOER und BACKER, 1954) versetzt, bis eine schwache Gelbfärbung blieb bzw. bis weitere Zugabe von Diazomethan-Lösung keine Stickstoffentwicklung mehr zur Folge hatte.

16.5. Trennung der Methylester-Derivate der 3- und 5-substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Die konzentrierten Äthylacetatextrakte der Methylestergemische wurden mit ausgezogenen Pasteur-Pipetten bandenförmig auf präparativen Schichten aufgetragen. Die Methylester-Derivate der 3- und 5-substituierten DHB-Isomeren wurden durch mehrmaliges Entwickeln der Platten in Chromatographiekammern bei Kammersättigung nach der aufsteigenden Methode getrennt. Fließmittelgemische sowie Herstellung und Daten der präparativen Platten s.S. 2o. Die getrennten Methylester wurden mit Äthylacetat vom Kieselgel eluiert und i.V. bei 2o°C bis zur Trockne eingeengt. Die kristallinen Methylester ließen sich in Benzin (4o/6o) umkristallisieren.

16.6. Rückspaltung von Methylestern nach CLAISEN (19o5)

Die Methylester wurden in Äthanol aufgenommen und die Lösungen im Eisbad gekühlt. Den kalten Lösungen wurden äquimolare Mengen Natrium-Methylat zugesetzt und gut durchmischt. Die Spaltung in verdünnter ätherischer Lösung ergab sofortigen dunkelbraunen Niederschlag, der auch durch Behandlung mit Tierkohle nicht beseitigt werden konnte. Setzte man der äthanolischen Lösung bei Raumtemperatur das Methylat zu, so kam es ebenfalls zu einer, wenn auch schwächeren Verfärbung. Nach dem Durchmischen wurden die Lösungen 1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Spaltung der Ester wurde mittels Dünnschichtchromatographie mit dem Fließmittelgemisch A verfolgt. Über Nacht kristallisierten die Natriumsalze im Kühlschrank aus. Sie wurden aus Wasser /

Äthanol umkristallisiert, wie oben beschrieben gewaschen und getrocknet.

16.7. Acetylierung der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-methylester

Zur Darstellung des 1,2-Diacetoxy-Derivates wurden 33o mg des Methylesters in 4 ml Pyridin gelöst und mit 2,5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Dieser Ansatz wurde 16 - 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie mit dem Fließmittelgemisch C verfolgt. Die Lösungsmittel wurden anschließend mit Benzol im Rotationsverdampfer entfernt. Das entstandene braune Öl wurde in Äthylacetat aufgenommen und mit den Fließmitteln C oder D chromatographiert. Die Substanzbande des 1,2-Diacetoxy-Derivates wurde mit Methylenchlorid vom Kieselgel eluiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels kristallisierte das reine 1,2-Diacetoxy-Derivat beim Stehen im Kühlschrank aus. Die 1,2-Diacetoxy-1,2-dihydrobenzoesäuremethylester ließen sich aus Wasser / Methanol umkristallisieren.

16.8. Darstellung des Isopropyliden-Derivates des 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters

Zu einer Suspension von 1oo mg Methylester in 5 ml 2,2,-Dimethoxypropan wurde unter Kühlung o,1 ml konzentrierte Salzsäure zugesetzt. Bei Raumtemperatur war die Reaktion nach 7 Stunden vollständig. Das Lösungsmittel wurde mit dem Rotationsverdampfer entfernt. Der kristalline Rückstand wurde in wenig Hexan umkristallisiert.

17. Chromatographische Methoden

17.1. Schichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-DC-Fertigplatten (Korngröße 6o mesh, Schichtdicke o,25 mm, Fluoreszenzindikator F_{254}, Fa. Merck, Darmstadt) verwendet.

Präparative Schichten (2o X 2o X o,1 cm^3) wurden mit Kieselgel 6o PF_{254} (Fa. Merck, Darmstadt) mit Hilfe eines Beschichtungsgerätes (TLC-Applicator, Fa. Camag, Muttenz, Schweiz) hergestellt. Sie wurden vor dem Gebrauch 5 Stunden bei 13o°C aktiviert.

Die folgenden Fließmittelgemische wurden benutzt:
A Diisopropyläther / Ameisensäure / Wasser 14o / 7 / 3
B Chloroform / Aceton 8o / 2o
C Diisopropyläther
D Methylenchlorid / Benzin (4o/6o) 8o / 2o
Es wurde in Chromatographiekammern bei Kammersättigung chromatographiert.

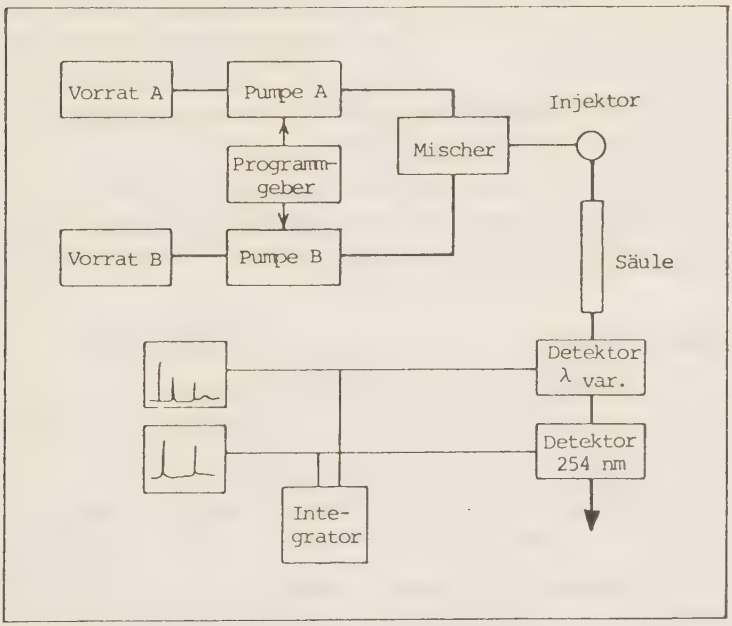
17.2. Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie stellt eine Weiterentwicklung der schon lange verwendeten Säulenchromatographie dar. Die letztere war traditionell eine langsame Technik, bei der eine Probe über Stunden oder Tage lief. Sie wurde deshalb in der Hauptsache für präparative Trennungen eingesetzt.

Die Entwicklung von Detektoren mit geringem Totvolumen, die Herstellung von sehr kleinen, gleichmäßigen Partikeln (5 - 1o µ) als Trennmaterial sowie die gute Fülltechnik der Säulen unter hohem Druck erlauben seit wenigen Jahren auch schnelles analytisches Arbeiten. Die dichtgepackten Partikel sorgen für eine rasche Einstellung des Gleichgewichtes, so daß Tailing vermieden wird. Aufgrund der dichten Packung der Partikel in

den engen, recht langen Säulen sind hohe Drucke (etwa 1oo - 2oo atm bei einer Säule von 25 cm X 1 mm Ø) für eine schnelle Analyse erforderlich.

Im verwendeten Hochdruck-Flüssigkeitschromatographen (Modell 42oo, Fa. Varian, Palo Alto, USA), wie er im Block-Schema wiedergegeben ist, wird der hohe Druck durch die beiden zwangsfördernden Langhub-Kolbenpumpen A und B erzeugt, die unabhängig von einander durch den Programmgeber gesteuert werden. So lassen sich zwei Flüssigkeitssysteme im beliebigen Verhältnis mischen. Die Probenlösungen wurden mit einer Hamiltonspritze nach Unterbrechung des Flusses mit Hilfe eines septumlosen Hochdruck-Injektors aufgetragen.



Block-Schema des Hochdruck-Flüssigkeitschromatographen

Mit einem Detektor (Spektralphotometer Variscan TM, Modell 635, 1. Serie, Fa. Varian-Techtron, Springvale, Australien) mit Mikrodurchflußzelle, dessen Wellenlänge von 2oo - 8oo nm variiert werden kann, wurden die Substanzen nachgewiesen. Ein Durchfluß-UV-Photometer mit Mikrodurchflußzelle (8 µl) mit konstanter Wellenlänge (254 nm) ist diesem nachgeschaltet.

Die mit einem Zwei-Kanal-Schreiber (Modell A-25, Fa. Varian, Walnut Creek, USA) aufgezeichneten Peaks wurden mit einem an die Photometer gekoppelten Integrator (Autolab System I, Fa. Spectra Physics, Santa Clara, USA) quantitativ ausgemessen.

Die Substanzen wurden mit Micro Pak C-H - Fertigsäulen (Fa. Varian; Korngröße 1o µ; Trennmaterial Octadecylsilan chemisch gebunden an LiChrosorb; Ø 2 mm; Länge 25 cm) aufgetrennt.

Als mobile Phase bei dieser sogenannten "reverse phase"-Adsorptionschromatographie, bei der das Lösungsmittel polarer als die stationäre Phase ist, wurde o,o1 M H_3PO_4 und 1% Propanol-2 benutzt. Bei dieser Art werden polare Substanzen vor den weniger polaren von der Säule eluiert.

Die Trennungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Je nach Substanz wurden die Fließmittel in den beiden Pumpen gemischt sowie die Flußrate variiert:

Benzoesäure (Bzt), 2-F-, 3-F- und 4-F-Bzt: Pumpe A 8o%, Pumpe B 2o%, Flußrate 5o ml/h, Druck 9o atm.

3-Cl-, 4-Cl-, 3-CH_3- und 4-CH_3-Bzt: Pumpe A 6o%, Pumpe B 4o%, Flußrate 5o ml/h, Druck 1oo atm.

3-Br- und 4-Br-Bzt: Pumpe A 5o%, Pumpe B 5o%, Flußrate 5o ml/h, Druck 12o atm.

3,5-diCl-Bzt: Pumpe A 3o%, Pumpe B 7o%, Flußrate 5o ml/h, Druck 15o atm.

3-F-, 5-F-, 3-Cl-, 5-Cl-, 3-Br-, 5-Br-, 3-CH_3- und 5-CH_3-DHB: Pumpe A 1oo%, Pumpe B o%, Flußrate 2o ml/h, Druck 75 atm.

18. Schmelzpunktsbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Schmelzpunktsbestimmungsapparat nach Dr. Tottoli (Fa. Büchi, Schweiz) bestimmt. Sie sind nicht korrigiert.

19. Spektroskopische Methoden

19.1. UV-Spektroskopie

Die UV-Spektren wurden mit einem DMR 1o oder DMR 21 Spektralphotometer (Fa. Zeiss, Oberkochem) in Quarzküvetten mit 1o mm Lichtweg bei 2o°C gemessen.

19.2. NMR-Spektrometrie

Die NMR-Spektren wurden mit den Varian-Kernresonanz-Spektrometern A-6o und HA-1oo aufgenommen. Als Lösungsmittel diente Deuterochloroform mit Tetramethylsilan als internem Standard. Die chemische Verschiebung wird in δ-Werten angegeben, gemessen am Mittelpunkt der halben Höhe der Integrationslinie.

19.3. IR-Spektroskopie

Die Spektren wurden mit einem Pye-Unicam Infrared Spectrophotometer SP 1ooo gemessen.

Feste Substanzen wurden mit einem Tropfen Nujol in einem kleinen Achatmörser fein zerrieben. Die Paste wurde dann zwischen Kochsalzplatten gepreßt.

Die Spektren der Substanzen in Tetrachlorkohlenstoff wurden mit einer Calciumfluorid-Zelle aufgenommen.

Ölige Substanzen wurden direkt zwischen den Kochsalzplatten gemessen.

19.4. Messung des Circular-Dichroismus

Für die Aufnahme der CD-Spektren wurde ein Cary-Recording-Spektropolarimeter Modell 6o mit Circular Dichroism Accessory 6oo3 (Cary Instruments, Monrovia, USA) benutzt. Die Spektren wurden mit Küvetten von o,2 cm Lichtweg bei 2o°C gemessen. Als Lösungsmittel diente Methanol "Uvasol". Gemessen wurden Lösungen mit Konzentrationen von 1 - 5 mM.
Die molare Elliptizität Θ wird in Grad x cm^2 x $decimole^{-1}$ angegeben.

19.5. Massenspektrometrie

Die Spektren wurden mit einem Massenspektrometer 21-492 (Fa. Du Pont, Monrovia, USA) bei einer Beschleunigungsspannung von 18oo Volt aufgenommen. Die Substanzen wurden hierfür in Glasröhrchen mit feinem Seesand abgedeckt und über den Festkörpereinlaß in die Ionenquelle eingeführt. Eine Aufheizung war wegen des hohen Dampfdruckes der Substanzen nicht erforderlich.

CHEMIKALIEN

Es wurden die handelsüblichen Chemikalien der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Spezielle Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:
Abbot Laboratories, North Chicago, USA: Novobiocin
Bayer Leverkusen: Penicillin G
C.F. Boehringer und Söhne, Mannheim: Biochemikalien und Kanamycinmonosulfat
Chemie Grünenthal GmbH, Stolberg: Colistinsulfat, Bacitracin
Eli Lilly und Co., Indianapolis, USA: Vancomycin
Fluka AG, Buchs, Schweiz: D-Cycloserin, 3-Chlor-, 3-Brom-,

4-Brom-, 4-Fluor-, 3-Methyl- und 4-Methylbenzoesäure
Lederle Arzneimittel, Cyanamid GmbH, München: Chlortetracyclin
L. Light and Co. Ltd., Colnbrook, England: 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin
Schuchardt-Merck, München: 3,5-Dichlor- und 4-Chlorbenzoesäure
Sigma Chemical Company, St.Louis, USA: 2-Fluor- und 3-Fluorbenzoesäure

Das angereicherte Präparat der Pyrocatechase wurde dankenswerter Weise von Herrn Erich Dorn zur Verfügung gestellt.

EXPERIMENTE und ERGEBNISSE

1. Wachstumsversuche mit Pseudomonas Stamm B 13

Obwohl viele Bakterien, die auf Benzoat (Bzt) wachsen, halogensubstituierte Benzoate mehr oder weniger rasch cometabolisieren, sind sie bis auf wenige Ausnahmen nicht in der Lage, diese als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten. Die wenigen Ausnahmen sind der Metabolismus von 2-F-Bzt (GOLDMAN et al., 1967), 4-F-Bzt (HARPER und BLAKLEY, 1971), 3-Cl-Bzt (JOHNSTON et al., 1972) und 4-Cl-Bzt (CHAPMAN, 1975) durch Pseudomonaden. Während die erstgenannten Organismen ihr Substrat wahrscheinlich über den β-Ketoadipinsäure-Weg abbauen, benutzt der 3-Cl-Bzt-Verwerter den Gentisinsäure-Weg. Das 4-Cl-Bzt wird höchstwahrscheinlich über den Protocatechuesäure-Weg umgesetzt.

Mit Pseudomonas Stamm B 13 wurde erstmals ein Organismus isoliert (DORN et al., 1974), der sehr rasches Wachstum auf 3-Cl-Bzt zeigt und dieses Substrat über den β-Ketoadipinsäure-Weg metabolisiert. Bis jetzt sind jedoch erst die Schritte bis zur Bildung der Halogenmuconsäuren untersucht. Der Nachweis der β-Ketoadipinsäure als Metabolit anhand der Rothera-Reaktion konnte eindeutig nur bei Inkubation mit halogenfreiem Substrat erbracht werden (DORN et al., 1974).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte an bestimmten Abbauschritten untersucht werden, warum Pseudomonas Stamm B 13 im Unterschied zum überwiegenden Teil der Organismen, die Benzoat verwerten können, das halogenierte Substrat nicht nur cometabolisieren, sondern auch metabolisch verwerten kann.

Pseudomonas Stamm B 13 wurde im 1ol-Fermenter angezogen, wobei die Konzentration der Kohlenstoffquelle anfangs o,2% betrug, was einer Konzentration von 13,9 mM Benzoat bzw. 12,8 mM 3-Cl-Bzt entsprach. Bis zu einer Konzentration von 4o mM wurde für beide Substrate keine Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit be-

obachtet.

Die Ausbeuten an Zellmasse für beide Substrate sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tab. 1 Zellertrag beim Wachstum auf Benzoat bzw. 3-Chlorbenzoat

Wachstums-substrat	Zellertrag in g Naßgewicht pro Liter	pro mmol Substrat
Benzoat	3,75	o,27
3-Chlor-benzoat	2,2	o,17

Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Anzucht und Substratkonzentrationen s. Text.

Pseudomonas Stamm B 13 kann also 3-Cl-Bzt gegenüber Benzoat nur zu 63% in Zellsubstanz umwandeln.

Wie die beiden Wachstumskurven in Abbildung 1 und 2 zeigen, wurden auf beiden Substraten unterschiedliche maximale optische Dichten erreicht. Auf gleiche Molarität umgerechnet ergeben sich für eine Konzentration von 1o mM die folgenden Werte: Benzoat 2,7; 3-Cl-Bzt 1,7. Die Dichte der Zellen nach Anzucht auf Benzoat lag also um etwa 6o% höher.

Weiterhin interessierte die Frage nach dem Verbleib des Halogensubstituenten während des Wachstums. Beim Wachstum auf 3-Cl-Bzt wurde bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase mehr als 8o% des ursprünglich organisch gebundenen Chlors, der Rest praktisch quantitativ in der stationären als Chlorid eliminiert. Während des Wachstums sank der pH-Wert von 7,4

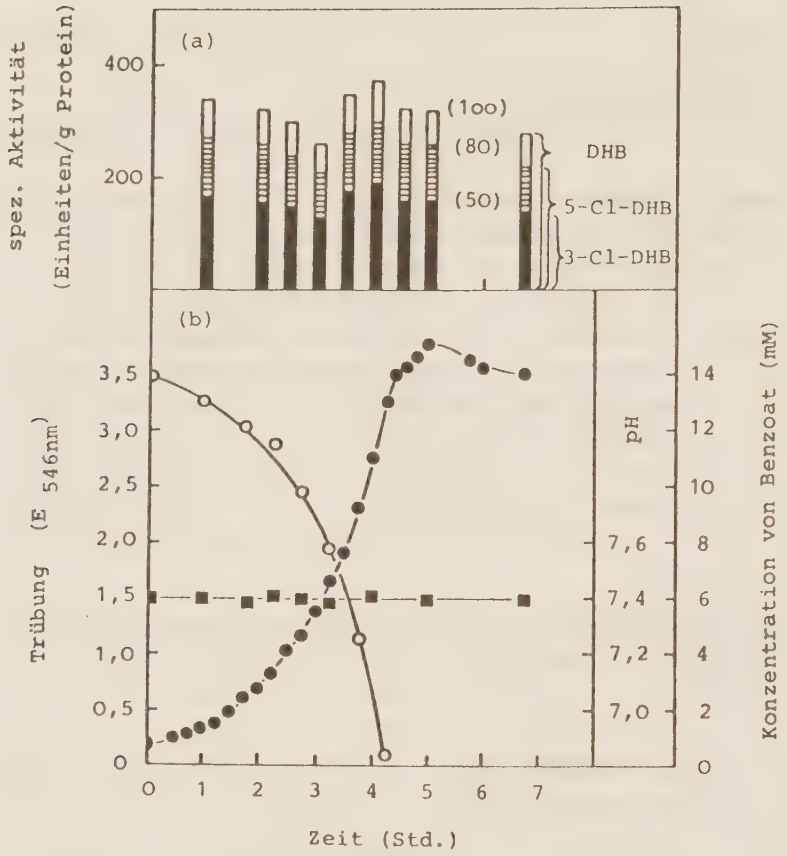


Abb.1 Wachstum von Pseudomonas Stamm B 13 mit Benzoat

(a) Spezifische Aktivität der DHB-Dehydrogenase im Rohextrakt

Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Zellen geerntet, mit der Frenchpresse aufgebrochen und 15 min bei 10000 g zentrifugiert. Die Aktivitäten für DHB, 3-Cl- und 5-Cl-DHB wurden unter Standardbedingungen (s. METHODEN 12.1.) mit dem jeweils Überstehenden bestimmt. Die Zahlen in Klammern geben die relativen Aktivitäten, bezogen auf DHB gleich 100, für die verschiedenen Substrate an.

(b) Substratverbrauch (○—○), pH (■—■) und Trübung (●—●) während des Wachstums im Fermenter

Der Verbrauch von Benzoat wurde mit der HPLC, wie unter METHODEN 17.2. beschrieben, bestimmt, das Wachstum durch Trübungsmessung bei 546 nm.

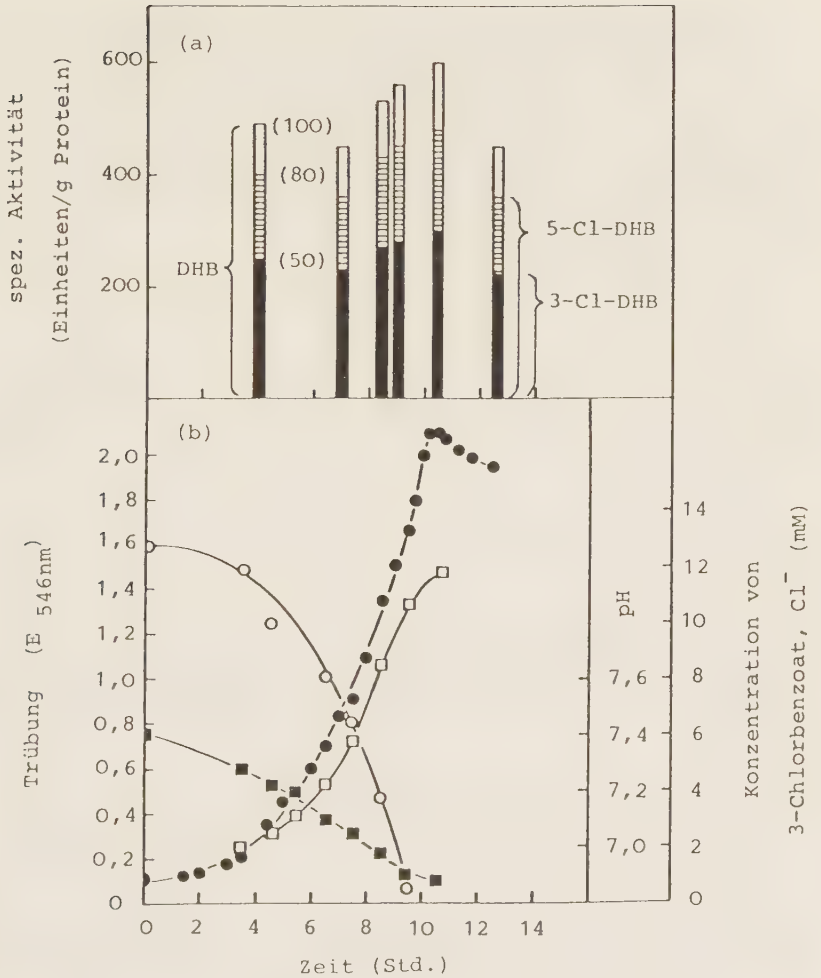


Abb.2 Wachstum von Pseudomonas Stamm B 13 mit 3-Chlorbenzoat

(a) Spezifische Aktivität der DHB-Dehydrogenase im Rohextrakt
Legende siehe Abbildung 1.

(b) Substratverbrauch (o—o), Eliminierung von Chlorid (□—□) und pH (■—■) während des Wachstums (●—●) im Fermenter

Der Verbrauch von 3-Chlorbenzoat wurde mit der HPLC gemessen, das Chlorid nach BERGMANN und SANIK (1957) bestimmt, das Wachstum durch Trübungsmessung bei 546 nm.

auf 6,9. Sollte eine Zelldichte größer als 1o erreicht werden, so mußte zusammen mit dem Substrat eine äquimolare Menge Natronlauge zugefüttert werden (KNACKMUSS et al., 1976). Der pH-Abfall muß auf der Akkumulation eines sauren Metaboliten beruhen, da der Gesamtumsatz bei vollständiger Veratmung des Substrates zu keiner pH-Änderung führen kann, wie die folgende Gleichung zeigt:

$$C_7H_4O_2ClNa + 7\,O_2 \longrightarrow 7\,CO_2 + 2\,H_2O + NaCl$$

Aus den Abbildungen 1 und 2 wird ersichtlich, daß Pseudomonas Stamm B 13 auf Benzoat schneller als auf 3-Cl-Bzt wächst. Bei Anzucht auf Benzoat kommt es zur Verdopplung der Trübung in 65 min, hingegen auf 3-Cl-Bzt in 135 min.

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen weiter, daß beim Wachstum auf 3-Cl-Bzt mehr DHB-Dehydrogenase als bei Anzucht auf Benzoat synthetisiert wird. Da sich die spezifische Aktivität der DHB-Dehydrogenase im Verlauf des exponentiellen Wachstums nur geringfügig änderte, wurden die Zellen für die Enzymanreicherungen in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet.

Bei Anzucht der Zellen auf Benzoat und 3-Cl-Bzt weisen die relativen Aktivitäten der DHB-Dehydrogenase für natürliches Substrat und die chlorierten Analoga (3-Cl- und 5-Cl-DHB) keinen Unterschied auf.

In der Tabelle 2 sind die Aktivitäten der ersten Enzyme des β-Ketoadipinsäure-Weges nach Anzucht von Pseudomonas Stamm B 13 auf Benzoat bzw. 3-Cl-Bzt zusammengestellt.

Tab.2 Spezifische Aktivitäten der ersten Enzyme des β-Ketoadipinsäure-Weges in Pseudomonas Stamm B 13 bei Anzucht auf Benzoat bzw. 3-Chlorbenzoat

Enzym	spez. Aktivität (Einheiten/g Protein)	
	Wachstumssubstrat	
	Benzoat	3-Chlorbenzoat
Benzoat-Dioxygenase 1+	83	161
DHB-Dehydrogenase 2+	37o	6oo
Pyrocatechase 2+	177	64o

1+: Aktivität gemessen an ganzen Zellen, s. METHODEN 12.2.
2+: Aktivität im Rohextrakt, Tests s. METHODEN 12.1. u. 12.3.
Die Aktivitäten wurden bestimmt von Zellen aus der späten exponentiellen Wachstumsphase.

Beim Wachstum auf Bzt wird also eine größere Zellausbeute und eine höhere Verdopplungsgeschwindigkeit beobachtet. Höhere spezifische Aktivitäten der Benzoat-Dioxygenase, der DHB-Dehydrogenase sowie der Pyrocatechase findet man jedoch beim Wachstum von Pseudomonas Stamm B 13 auf 3-Cl-Bzt.

Dennoch müssen noch weitere Unterschiede beim Wachstum auf beiden Substraten vorhandensein, da die Umstellung vom einen auf das andere Substrat etwa 2 Tage benötigt.

2. Isolierung von 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktase negativen Mutanten von Pseudomonas Stamm B 13

Die üblichen Verfahren zur Isolierung von Mutanten (SCHLEGEL, 1965; SCHLEGEL und JANNASCH, 1967) unterteilen sich in die vier Schritte Mutationsauslösung, Ausprägung des Phänotypes, Anreicherung und Selektion. Das Ziel der folgenden Versuche war, Methoden auszuarbeiten, um die gewünschten Defekt-Mutanten des β-Ketoadipinsäure-Weges schnell zu erhalten.

2.1. Mutationsauslösung

Aus der großen Palette der mutagenen Agenzien wurden 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NMG) und salpetrige Säure ausgewählt. Außerdem wurden Mutationen mit ultraviolettem Licht induziert.

Mit NMG, das zu den wirksamsten mutationsauslösenden Agenzien gehört, und UV-Licht wurden jeweils Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase mutiert. Hierzu wurden für den Umgang mit NMG Arbeitstechniken von ADELBERG et al. (1965) an Escherichia coli, von REH (1967) an Hydrogenomonas H16 und ORNSTON (1966) an Pseudomonas putida berücksichtigt. HEGEMAN (1966) stellte Mutanten von Pseudomonas putida mit UV-Licht her. Für die Mutagenisierung mit salpetriger Säure wurden die gleichen Bedingungen gewählt, wie sie KAUDEWITZ (1959) für Escherichia coli beschrieb. Die Abtötungskurven für alle drei Methoden sind in den Abbildungen 3a, 3b und 3c wiedergegeben.

Da bei Versuchen zur direkten Isolierung keine gewünschten Mutanten gefunden wurden, war die Ausarbeitung einer Anreicherungstechnik unumgänglich.

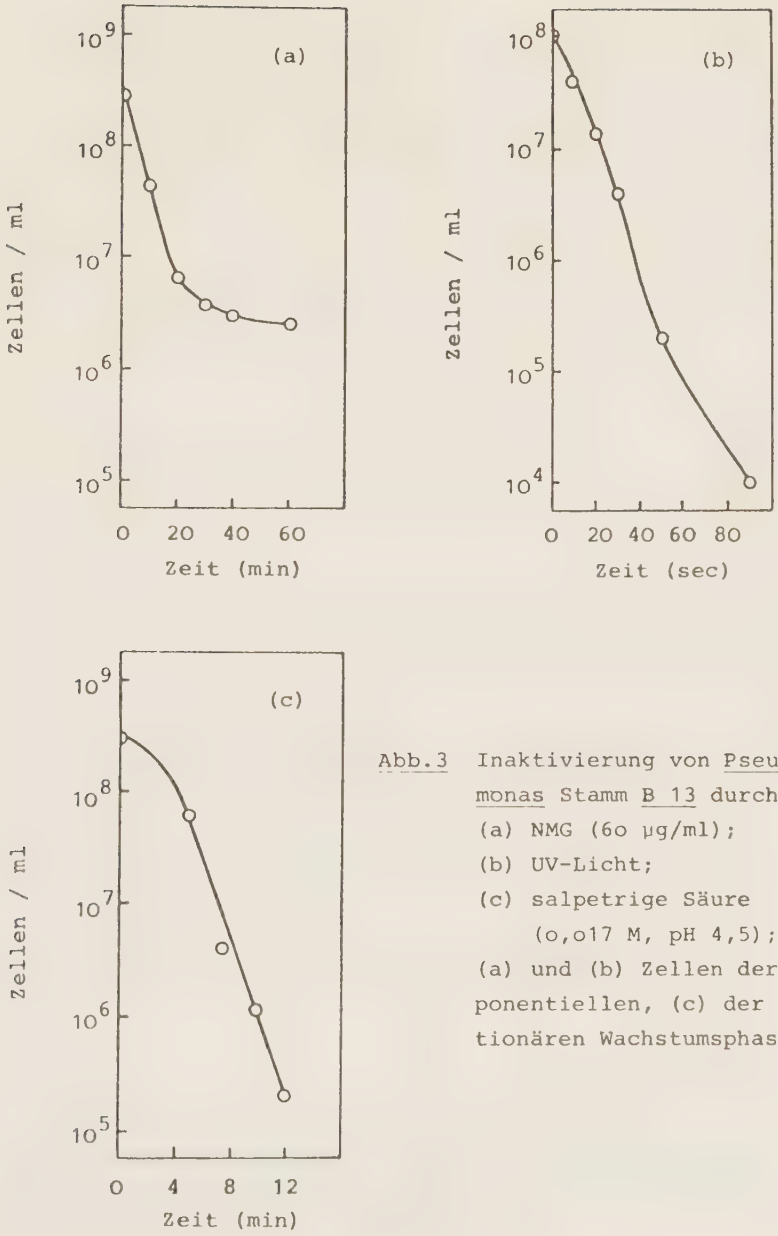


Abb.3 Inaktivierung von Pseudomonas Stamm B 13 durch
(a) NMG (60 µg/ml);
(b) UV-Licht;
(c) salpetrige Säure (0,017 M, pH 4,5);
(a) und (b) Zellen der exponentiellen, (c) der stationären Wachstumsphase

2.2. Ausarbeitung einer Methode zur Anreicherung

Die entscheidenden Ideen für die Anreicherung von Mutanten wurden in den Arbeiten von DAVIS (1948), LEDERBERG und ZINDER (1948) sowie LEDERBERG (195o) mit der Penicillin-Methode vorgestellt. Das Grundprinzip einer Anreicherung ist die selektive Abtötung wachsender Zellen mit Agenzien, die nichtwachsende Zellen unbeeinträchtigt lassen. Eine Zellsuspension ist also solchen Bedingungen auszusetzen unter denen die Mutanten nicht wachsen, und die wachsenden Wildtypzellen abgetötet werden. Eine solche Behandlung führt daher zu einer relativen Anreicherung der Mutanten.

2.2.1. Bestimmung der Empfindlichkeit von Pseudomonas Stamm B 13 gegenüber Antibiotika

Die bakterizide Wirkung verschiedener Antibiotika auf Pseudomonas Stamm B 13 war zu untersuchen. In einem Reihenverdünnungstest wurden die Grenzkonzentrationen ermittelt, die gerade noch das Wachstum der Bakterien unterdrücken.

Tab.3 Grenzkonzentrationen von Antibiotika zur Unterdrückung des Wachstums von Pseudomonas Stamm B 13

Antibiotikum	Einheiten bzw. µg/ml
Penicillin G	2oo
Streptomycin-Sulfat	1o
Novobiocin	6oo
Vancomycin	6oo
Chlortetracyclin	2
Kanamycin-mono-sulfat	1
Colistinsulfat	1
Bacitracin	25oo
Cycloserin	2oo

Schon bei geringer Konzentration (1 - 2 µg/ml) bestand gegenüber Chlortetracyclin, Kanamycin-mono-sulfat und Colistinsulfat eine große Empfindlichkeit. Streptomycinsulfat, Penicillin G und Cycloserin unterdrückten das Wachstum bei einer Konzentration von 1o - 2oo µg bzw. Einheiten/ml, während eine Konzentration oberhalb von 6oo µg/ml der Antibiotika Novobiocin, Vancomycin und Bacitracin für eine Hemmung notwendig waren.

2.2.2. Abtötung wachsender und ruhender Zellen durch Antibiotika

Um die Antibiotika für die Anreicherung von Defekt-Mutanten des β-Ketoadipinsäure-Weges zu finden, wurden wachsende und ruhende Wildtypzellen mit den Antibiotika bei verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Wachsende Zellen wurden mit vollständiger Nährlösung mit dem jeweiligen Antibiotikum bebrütet, während in einem Parallelansatz ausgewachsene, über Nacht verarmte Zellen mit Nährlösung ohne Substrat dem Antibiotikum ausgesetzt wurden. Nach vierstündiger Einwirkung des zu prüfenden Antibiotikums wurde die Lebendzellzahl in beiden Ansätzen, bezogen auf einen Ansatz ohne Antibiotikum, bestimmt.

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich wird, wirkten Penicillin G und Glycin auf die wachsenden Zellen stark bakterizid, während ruhende Zellen so gut wie nicht abgetötet wurden. Colistinsulfat setzte die Lebendzellzahl bei der im Reihenverdünnungstest ermittelten Konzentration von 1 µg/ml nicht herab. Bei einer Konzentration von 1o µg/ml wurden wachsende und ruhende Zellen im gleichen Maße abgetötet.

Legende zu Tab.3:

Röhrchen mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums in 2,5 ml Minimal-Medium mit 3-Chlorbenzoat wurden jeweils mit einem Tropfen einer verdünnten Suspension beimpft und in Schräglage 24 Stunden auf einem Rollbebrüter bei 28 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte visuell.

Tab.4 Abtötung wachsender und ruhender Zellen durch verschiedene Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration µg bzw. E/ml	wachsende Zellen % Abtötung	ruhende Zellen % Abtötung
Penicillin G	2ooo	99,7	o
	5oo	97,6	o
	2oo	45	o
Colistin-sulfat	1o	99,99	87
	1	o	o
Glycin	3o ooo	98,6	o

Angaben s. Text und Abbildung 4.

Die Abbildungen 4a und 4b veranschaulichen, daß bei einer längeren Inkubationszeit größere Unterschiede zwischen der Abtötung wachsender und ruhender Zellen auftraten.

Die Zahl der zur Koloniebildung befähigten Zellen nahm in 1o Stunden bei einer Penicillin-Konzentration von 2ooo Einheiten / ml für wachsende Zellen um 99,98%, für ruhende nur um 15% ab. Bei 3% Glycin im Ansatz waren es 99,95% der Zellen unter Wachstumsbedingungen, jedoch nur 65% in Abwesenheit eines Substrates.

Nach den vorangehenden Ergebnissen sollten Penicillin G und Glycin, welche von LIU et al. (1964) zur Anreicherung von Pseudomonas-Arten verwendet wurden, für die Anreicherung von Mutanten von Pseudomonas Stamm B 13 geeignet sein.

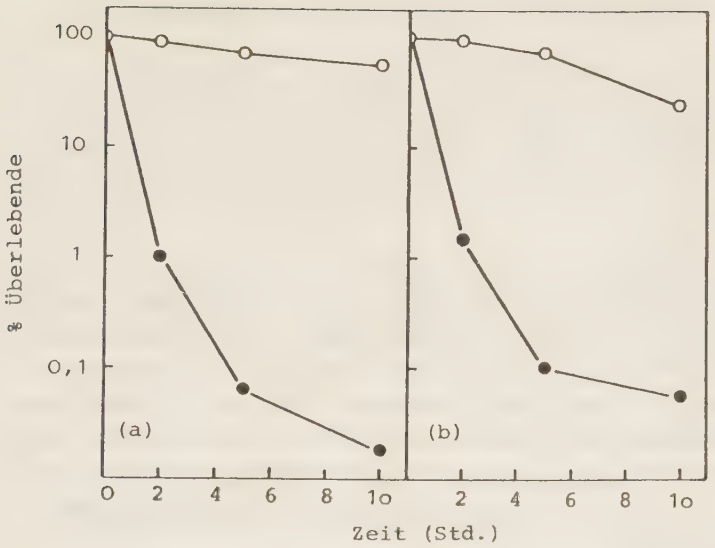


Abb.4 Abnahme der Lebendzellzahl wachsender und ruhender Zellen

(a) während der Inkubation mit 2ooo Einheiten Penicillin G / ml

(b) bei einer Glycin-Konzentration von 3% im Inkubationsansatz

Wachsende Zellen (●—●): Pseudomonas Stamm B 13 wurde 5 Stunden in 4 ml vollständiger Nährlösung vorinkubiert, bevor 2 ml Lösung des zu prüfenden Agens und 4 ml 5o%ige Saccharose-Lösung zugesetzt wurden. Die Suspension enthielt $1o^8$ Zellen / ml.

Ruhende Zellen (o—o): Eine Kultur von 4 ml mit 2,5 X $1o^8$ Zellen / ml wurde 17 Stunden im Medium ohne Substrat inkubiert. Dann wurden 2 ml Penicillin G - oder Glycin-Lösung und 4 ml 5o%ige Saccharose-Lösung hinzugegeben.

Die Ansätze wurden unter Schütteln inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, verdünnt und auf NB-Agar plattiert.

2.3. Selektion von Mutanten des β-Ketoadipinsäure-Weges

Eine direkte Selektion der Mutanten durch Wachstum auf Phenol oder Brenzcatechin war wegen der Autoxidation dieser Substrate nicht möglich. Dennoch wurde auf dem folgenden Weg versucht, die Anzahl der verschiedenen Mutanten einzuschränken.

Von den Kolonien, die auf Platten mit 5 mM 3-Cl-Bzt und 1 mM Succinat nach 3 Tagen gewachsen waren, wurden die kleinsten abgepickt und auf NB-Agar übertragen. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden wurden die Kolonien mit sterilen Samtstempeln (LEDERBERG und LEDERBERG, 1952) auf Minimalplatten mit 5 mM Benzoat, 3-Cl-Bzt und 4-OH-Bzt überimpft. 4-OH-Bzt wurde gewählt, um mögliche Infektionskeime weitgehend auszuschließen, da nur wenige Organismen auf diesem Substrat wachsen können.

Die Mutanten, die weder auf Benzoat noch auf 3-Cl-Bzt wuchsen, wurden auf NB-Agar übertragen und so für die weitere Selektion gesammelt. Diese Mutanten wurden in Rollröhrchen mit 5 mM Succinat und 1 mM 3-Cl-Bzt überimpft und 24 Stunden bei 28°C auf einem Rollbebrüter in Schräglage inkubiert. Aus den weiteren Untersuchungen wurden die Mutanten ausgeschlossen, deren Kulturflüssigkeit aufgrund von Brenzcatechinausscheidung braun wurde. Sie konnten nicht den gewünschten Block in der DHB-Dehydrogenase haben.

Alle übrigen Proben wurden durch Zentrifugation von den Zellen befreit. Aus dem jeweilig Überstehenden wurden Proben mit ausgezogenen Schmelzpunktskapillaren bandenförmig auf Dünnschicht-Fertigplatten aufgetragen. Diejenigen Mutanten, deren Kulturflüssigkeit nach Trocknung bei einmaliger Auftragung eine Löschung des Fluoreszenzindikators bewirkte, d.h. die sich als blaue Flecke auf grünem Grund abzeichnete, wurden nicht weiter untersucht. Die Akkumulation von DHB bewirkt selbst in hoher Konzentration nur eine schwache Fluoreszenzlöschung. Die bei der Mehrzahl der Mutanten aufgetretene star-

ke Löschung war auf die Ausscheidung von Muconsäuren zurückzuführen. Die Kulturflüssigkeiten der restlichen, schwach löschenden Proben wurden im Rotationsverdampfer eingeengt und dann auf Kieselgel-Fertigplatten mit dem Fließmittelgemisch A chromatographiert. Mittels Referenzsubstanzen wurden die Flecke zugeordnet und so der Defekt im β-Ketoadipinsäure-Weg erkannt.

Mutanten, die DHB ausschieden, wurden weiter untersucht. Es wurden drei Mutanten mit den gewünschten Eigenschaften gefunden, von denen zwei durch Rückmutation verloren gingen.

2.4. Charakteristika der Mutante Pseudomonas Stamm B 13/27 B

Die Mutante Pseudomonas Stamm B 13/27 B wächst ebenso wie der Wildtyp auf 4-OH-Bzt. Die Zeit zur Verdopplung der Trübung beträgt bei Anzucht auf Succinat 9o min. Beim Wachstum auf Succinat mit nachfolgender Induktion durch Benzoat oder 3-Cl-Bzt kann keine DHB-Dehydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden, stattdessen kommt es zur Akkumulation von DHB bzw. 3-Cl- und 5-Cl-DHB. Leider lassen sich nur relativ geringe Benzoat-Dioxygenase-Aktivitäten induzieren.

Die gefundene Mutante ist bezüglich der spezifischen Aktivität der Benzoat-Dioxygenase nicht mit der entsprechenden Mutante B 9 von Alcaligenes eutrophus vergleichbar.

3. "Doppelhydroxylierung" von Benzoat

Die Benzoat-Dioxygenase ist in der Regel im zellfreien Extrakt wegen der Instabilität des Enzymkomplexes+ nicht meßbar. MANDELSTAM und JACOBY (1965), KEMP und HEGEMAN (1968), KENNEDY und FEWSON (1968) sowie KNACKMUSS und REINEKE (1973) bestimmten die Benzoat-Dioxygenase mit intakten Zellen. Nur in einem Fall (ICHIHARA et al., 1962) wurde an Pseudomonas aeruginosa, Micrococcus ureae und Pseudomonas fluorescens eine relativ stabile Aktivität im zellfreien Extrakt nachgewiesen.

Der Benzoat-Umsatz wurde in den älteren Arbeiten durch Messung der Sauerstoffaufnahme bestimmt, die jedoch durch endogenen Metabolismus von $NADH_2$ oder Metabolismus von Produkten der Benzoat-Oxidation verfälscht war (ICHIHARA et al., 1962; REINEKE, 1973).

FEWSON et al. (197o) beschrieben in einer kurzen Mitteilung eine Methode, bei der solche Unsicherheiten nicht auftreten. Sie bestimmten die Aktivität anhand der Benzoat-Abnahme und meinten die Kriterien spezifisch, empfindlich und schnell seien erfüllt. So ließ sich eine reproduzierbare Restaktivität von 3% im zellfreien Extrakt gegenüber der in ganzen Zellen nachweisen.

Eine weitere Möglichkeit, die Benzoat-Dioxygenase-Aktivität im zellfreien System zu messen, wurde von REINER (1971) vorgestellt. Er setzte ^{14}Carboxyl-markiertes Benzoat mit Extrakt zum DHB um und bestimmte das markierte CO_2, das durch die stabile DHB-Dehydrogenase durch Decarboxylierung des DHB zum Brenzcatechin freigesetzt wurde.

+ Während der Niederschrift dieser Arbeit wurde die Annahme bestätigt, daß sich die Benzoat-Dioxygenase aus mehreren Proteinen aufbaut, was die Instabilität bei Zellaufschluß erklärt. Nach YAMAGUCHI, YAMAUCHI und FUJISAWA (1975) Biochem. Biophys. Res. Comm. 67, 264-271, besteht das Benzoat-Dioxygenase-System aus zwei Proteinkomponenten.

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode der Messung der Benzoat-Abnahme mittels HPLC, wie sie unter METHODEN 12.2. beschrieben wurde, erfüllt, ebenso wie die zuletzt aufgeführten Methoden, die Kriterien spezifisch und empfindlich, doch ist sie aufgrund ihrer Einfachheit und Schnelligkeit allen anderen überlegen.

3.1. Bestimmung von Substituenteneinflüssen auf die Oxygenierung von Benzoat

Da Halogene am Aren nur schwer nucleofug verdrängbar sind, findet man ihre Eliminierung vom Aromaten bei Bakterien entsprechend selten oder überhaupt nicht. Dagegen sind Alkylhalogenide wesentlich reaktiver. So beobachtet man beim biologischen Abbau, soweit genau bekannt, die Eliminierung nach Aufhebung der Aromatizität (HARPER und BLAKLEY, 1971). Nur wenige Beispiele (JOHNSTON et al., 1972; CHAPMAN, 1975; LINGENS, 1975; RIBBONS, persönliche Mitteilung) deuten eine Eliminierung auf einer aromatischen Stufe an, wenngleich in keinem Fall der Mechanismus aufgeklärt ist. Bekannt ist nur, daß nach der Eliminierung ein halogenfreier Aromat auftritt.

Halogenaromatische Verbindungen müssen im allgemeinen über eine Reihe von Schritten bis zu einer nicht-aromatischen Stufe umgesetzt werden. Der erste katabolische Schritt, der zu einem nicht-aromatischen Zustand führt, ist die Arendioxygenierung, hier die Benzoat-Dioxygenase-Reaktion.

Der cometabolische Umsatz von Benzoat durch die Benzoat-Dioxygenase wird, wie KNACKMUSS und REINEKE (1973) zeigen konnten, durch Substituenten am Kern mehr oder weniger verlangsamt. Die relativen Geschwindigkeiten der Oxygenierung substituierter Benzoate zeigten eine deutliche Abhängigkeit von der Stellung und der Art des Substituenten. Sterische und polare Substituenteneinflüsse konnten aufgeschlüsselt werden.

3.1.1. Benzoat-Dioxygenase in Pseudomonas Stamm B 13

Es galt zu prüfen, ob die Benzoat-Dioxygenasen eines 3-Cl-Bzt und eines Benzoat verwertenden Bakteriums, Pseudomonas Stamm B 13 und Alcaligenes eutrophus, unterschiedliche Umsatzspezifitäten aufweisen.

Dazu wurden Zellen von Pseudomonas Stamm B 13 nach Anzucht auf 3-Cl-Bzt mit verschieden substituierten Benzoaten im Phosphat-Puffer ohne Stickstoffquelle inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden durch Zugabe der Zellen gestartet. Da die absoluten Umsatzkinetiken für substituierte Benzoate schwer reproduzierbar waren, wurde jeweils auf eine Referenzprobe mit Benzoat als Substrat bezogen.

Wie unter METHODEN 12.2. beschrieben, wurde die anfängliche Substratabnahmerate (1 - 5 min) auf den vollständigen Umsatz extrapoliert.

Die relativen Umsatzraten der substituierten Benzoate sind in der Tabelle 5 wiedergegeben.

Im großen und ganzen stimmen die relativen Umsatzraten für substituierte Benzoate mit den bei Alcaligenes eutrophus gefundenen überein. Wiederum werden alle substituierten Benzoate sehr viel langsamer als Benzoat oxygeniert. Alle meta-substituierten Benzoate werden beträchtlich schneller als die para-substituierten umgesetzt. Demnach scheint Pseudomonas Stamm B 13 keine besondere Benzoat-Dioxygenase für das Wachstum auf 3-Cl-Bzt zu benötigen.

Vergleicht man die Verdopplungszeiten von Pseudomonas Stamm B 13 auf Benzoat mit 65 min und 3-Cl-Bzt mit 135 min miteinander, so stellt sich die Frage, wie dieser geringe Unterschied möglich ist, wenn man die beiden relativen Umsatzgeschwindigkeiten für Benzoat und 3-Cl-Bzt von 1oo% und 3o% berücksichtigt. Synthetisiert Pseudomonas Stamm B 13 neben einer speziellen Pyrocatechase für die Spaltung von Halogenbrenzcatechinen (DORN,

Tab.5 Aktivität der Benzoat-Dioxygenase nach Anzucht von Pseudomonas Stamm B 13 auf Benzoat bzw. 3-Chlorbenzoat für substituierte Benzoate

Substrat	rel.Aktivität bezogen auf Benzoat = 1oo	
	Wachstumssubtrat	
	Benzoat	3-Chlorbenzoat
Bzt	1oo	1oo
3-Cl-Bzt	18	31
4-Cl-Bzt	n.t.	o,o4
3,5-diCl-Bzt	n.t.	o,o7
3-Br-Bzt	9	9
3-CH_3-Bzt	8	13
4-CH_3-Bzt	n.t.	o,2
2-F-Bzt	15	15
3-F-Bzt	37	67
4-F-Bzt	26	23
3-J-Bzt	n.t.	1,o

3o µmole Substrat in 15 ml Kulturflüssigkeit, das entspricht einer Konzentration von 2 mM, wurden in folgender Zeit durch die folgenden Proteinmengen an ganzen Zellen umgesetzt:
Zellen nach Anzucht auf Benzoat: 16 - 8o mg Protein/Ansatz setzten in 23 - 6o min die angegebene Menge Substrat vollständig um.
Zellen nach Anzucht auf 3-Chlorbenzoat: 15 - 75 mg Protein/Ansatz cometabolisierten die oben angegebene Menge Substrat in 11 - 27 min; Umsatzdauer für schwer umsetzbare Substrate, s. oben, bis zu 1ooofach länger.
Messung der Substratabnahme s. Text und METHODEN 12.2.
n.t. nicht getestet

1976) beim Wachstum auf 3-Cl-Bzt auch eine besondere Benzoat-Dioxygenase, oder wählt er einen anderen Weg, um das substituierte Substrat schnell genug umzusetzen?

Mit Zellen nach Anzucht auf Benzoat wurden deshalb die relativen Umsatzgeschwindigkeiten von repräsentativen substituierten Benzoaten bestimmt.

Wie Tabelle 5 zeigt, sind die relativen Umsatzgeschwindigkeiten der substituierten Benzoate bei Anzucht der Zellen auf beiden Substraten sehr ähnlich. Es wird beim Wachstum auf 3-Cl-Bzt die gleiche Benzoat-Dioxygenase wie auf Benzoat von Pseudomonas Stamm B 13 gebildet.

Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Benzoat-Dioxygenase (s. Tab.2) bei beiden Anzuchtsbedingungen macht den geringen Unterschied der Wachstumsgeschwindigkeiten trotz der erheblichen Unterschiede der Umsatzraten beider Substrate erklärbar. Pseudomonas Stamm B 13 bildet auf 3-Cl-Bzt die gleiche Benzoat-Dioxygenase, synthetisiert aber mehr Enzym, um so den verlangsamten Umsatz des Halogenbenzoates auszugleichen.

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, werden para-substituierte Benzoate sehr viel schlechter als die meta-substituierten umgesetzt. Bei den Halogenbenzoaten läßt sich dieser Unterschied mit den mesomeren Effekten (+M) zwanglos erklären. Der beträchtliche Unterschied zwischen 3-CH_3- und 4-CH_3-Bzt kann so jedoch nicht gedeutet werden, vielmehr muß eine sterische Hinderung in 4-Stellung zu diesem Ergebnis beitragen.

Um die polaren Einflüsse der Substituenten auf die relative Geschwindigkeit der Oxygenierung ohne Verfälschung durch sterische Einflüsse analysieren zu können, mußte ein Organismus gesucht werden, bei dem auch para-substituierte Benzoate ohne sterische Hinderung umgesetzt werden.

3.1.2. Benzoat-Dioxygenase in Pseudomonas putida (arvilla) mt2

Pseudomonas putida (arvilla) mt2 sollte über eine stereounspezifische Dioxygenase verfügen, da er auf Benzoat, 3-CH_3- und 4-CH_3-Bzt wachsen kann.

Wie WILLIAMS und MURRAY (1974) zeigen konnten, besitzt Pseudomonas putida (arvilla) mt2 zwei Benzoat-Dioxygenasen mit unterschiedlichen Spezifitäten, eine "normale", wie sie ähnlich in Alcaligenes eutrophus (KNACKMUSS und REINEKE, 1973) und Pseudomonas Stamm B 13 gefunden wurde, und eine "unspezifische" Dioxygenase. Die erste ist auf dem Chromosom, die zweite auf einem Plasmid codiert.

Anhand der Sauerstoffaufnahmeraten, die mit Zellen des Wildtyps und Mutanten, die das Plasmid verloren hatten, gemessen wurden, konnten WILLIAMS und MURRAY (1974) nachweisen, daß durch Benzoat beide Typen von Benzoat-Dioxygenase induziert werden. 3-CH_3-Bzt ist hingegen nur Induktor der "unspezifischen" Dioxygenase.

Pseudomonas putida (arvilla) mt2 wurde, da eine "unspezifische" Dioxygenase untersucht werden sollte, auf 3-CH_3-Bzt angezogen und, wie unter METHODEN 12.2. beschrieben, die Umsatzgeschwindigkeiten für substituierte Benzoate bestimmt.

Die oben angestellten Überlegungen wurden, wie die Tabelle 6 zeigt, bestätigt. Die Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeiten von der Art, der Polarität, sowie von der Stellung des Substituenten am aromatischen Kern wird deutlich. Der +M-Effekt bzw. Hyperkonjugationseffekt eines Substituenten, der für die unterschiedlichen Umsatzraten von meta- und parasubstituiertem Substrat einzig verantwortlich sein kann, bewirkt einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Substutionsisomeren, wenngleich er geringer ist als mit den

Benzoat-Dioxygenasen aus Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas Stamm B 13.

Tab.6 Aktivität der Benzoat-Dioxygenase mit substituierten Benzoaten aus Pseudomonas putida (arvilla) mt2 bei Anzucht auf 3-Methylbenzoat

Substrat	rel. Aktivität bezogen auf Benzoat = 1oo
Bzt	1oo
3-Cl-Bzt	58
4-Cl-Bzt	38
3,5-diCl-Bzt	1o
3-Br-Bzt	39
4-Br-Bzt	22
3-CH_3-Bzt	83
4-CH_3-Bzt	62
2-F-Bzt	0,9
3-F-Bzt	17
4-F-Bzt	14

Unter Ruhebedingungen wurden 3o µmole Substrat im Ansatz von 15 ml durch ganze Zellen (23 - 115 mg Protein) in 15 - 28 min vollständig umgesetzt. Die Substratabnahme wurde, wie unter METHODEN 12.2. beschrieben, gemessen und die Anfangssteigung der Abnahme auf den Gesamtumsatz extrapoliert.

3.2. Analyse der Oxygenierungsprodukte beim Umsatz meta-substituierter Benzoate

KNACKMUSS und REINEKE (1973) konnten nachweisen, daß aufgrund von sterischen Substitutionseinflüssen aus meta-substituierten Benzoaten jeweils zwei isomere Produkte gebildet werden. Das Verhältnis der in ungleichen Mengen entstehenden 3- und 5-substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren wurde als Ausdruck der Angriffsspezifität der Benzoat-Dioxygenase erkannt.

Mit der Mutante Pseudomonas Stamm B 13/27 B sollte die Frage beantwortet werden, ob der 3-Cl-Bzt verwertende Organismus gegenüber Alcaligenes eutrophus eine andere Angriffsspezifität aufweist.

Die Zellen der Mutante, wie unter METHODEN 3. beschrieben angezogen und induziert, wurden unter Ruhebedingungen mit 3-F-, 3-Cl-, 3-Br- und 3-CH_3-Bzt sowie 2-F-Bzt inkubiert. Nach verschiedenen Intervallen wurden Proben abzentrifugiert und mit der HPLC chromatographiert. Neben den beiden isomeren Produkten der Oxygenierung war jeweils ein nicht identifiziertes Artefakt nachweisbar. Das Verhältnis der Produktpeaks war über den gemessenen Zeitraum von 24 Stunden durchweg konstant.

Ein exemplarisches Chromatogramm für jedes Isomerenpaar ist in Abbildung 5 zu sehen.

Aus den Peakflächen ließen sich unter Berücksichtigung der jeweiligen Extinktionskoeffizienten bei 254 nm die Isomerenverhältnisse berechnen. Sie sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Das gleiche Isomerenverhältnis wurde bei Benzoat und 3-Cl-Bzt induzierten Zellen gefunden. Bei Bildung von verschiedenen Benzoat-Dioxygenasen unter beiden Bedingungen waren unterschiedliche Isomerenverhältnisse zu erwarten.

Das Verhältnis der Methyl-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren konnte nicht bestimmt werden, da die Isomeren nicht getrennt werden konnten. KNACKMUSS et al. (1976) konnten auf-

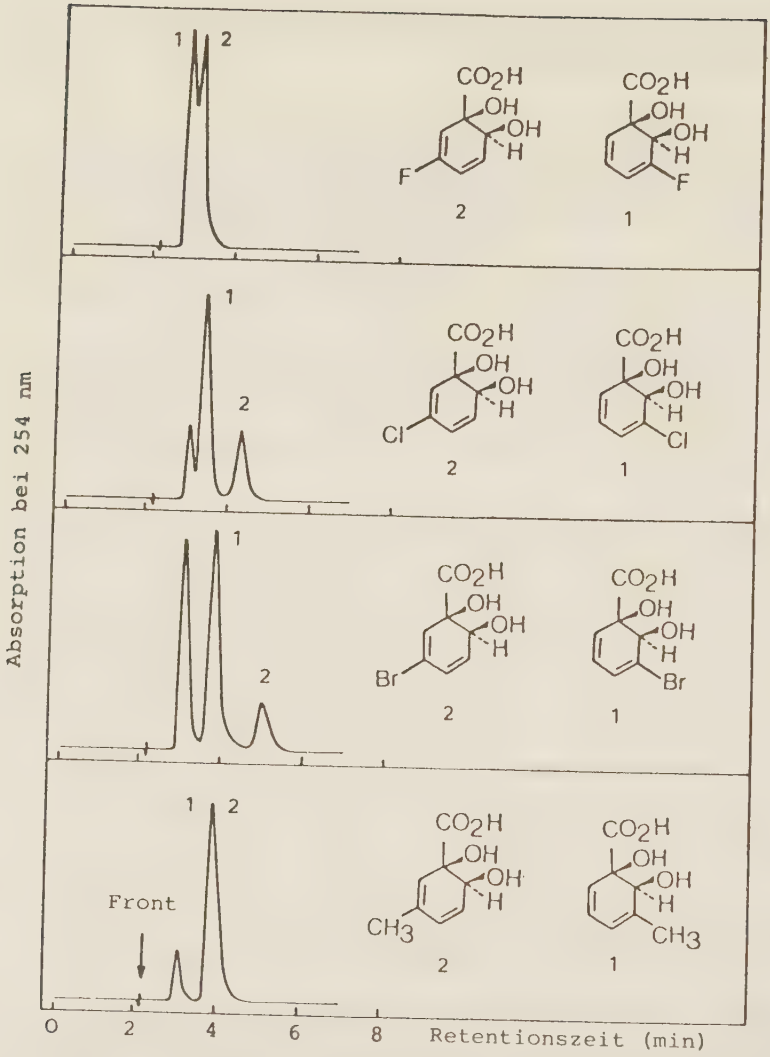
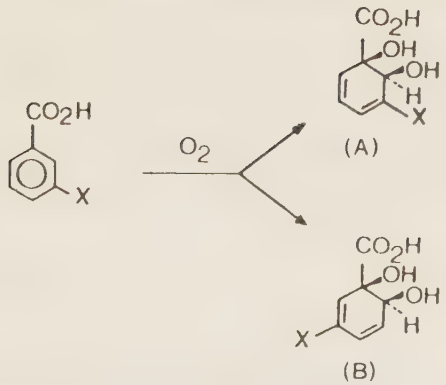


Abb.5 Hochdruck-Flüssigkeitschromatogramme der aus meta-substituierten Benzoaten gebildeten 3- und 5-substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Fließmittel, Flußrate, Druck, Säule sowie weitere Angaben siehe METHODEN 17.2. und Text.



Bildung von zwei Oxygenierungsprodukten aus meta-substituierten Benzoaten durch die Benzoat-Dioxygenase.

Tab.7 Isomerenverhältnisse der aus meta-substituierten Benzoaten gebildeten Oxygenierungsprodukte

Substituent (X)	Produkt (A) / Produkt (B)
Fluor	1,4 / 1
Chlor	2 / 1
Brom	3 / 1
Methyl	9 / 1 +

+ übernommen von KNACKMUSS et al. (1976).
Durchführung und Berechnung der Isomerenverhältnisse siehe Text.

grund der Ausscheidung der beiden isomeren Lactone ein Verhältnis von 9 / 1 für 3-CH_3- und 5-CH_3-DHB ermitteln, denn nur die Benzoat-Dioxygenase entscheidet über das Mengenverhältnis der entstehenden isomeren Intermediate.

Aus 2-F-Bzt entstanden eine Vielzahl von Produkten, gleichzeitig wurden etwa 5o% des organisch gebundenen Fluors als Fluorid freigesetzt (SCHREIBER, 1976).

Pseudomonas Stamm B 13 synthetisiert also bei Induktion mit Benzoat und 3-Cl-Bzt Benzoat-Dioxygenasen mit gleicher Angriffs- bzw. Affinitätsspezifität für meta-substituierte Benzoate. Die Benzoat-Dioxygenasen aus Pseudomonas Stamm B 13 und Alcaligenes eutrophus weisen ähnliche Angriffsspezifitäten auf.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Spezifität des Umsatzes substituierter Benzoate sowie der Angriffsspezifität für meta-substituierte Benzoate zeigen, daß Pseudomonas Stamm B 13 auf 3-Cl-Bzt die gleiche Benzoat-Dioxygenase wie auf Benzoat bildet. Beim Wachstum auf 3-Cl-Bzt wird der durch den Substituenten verlangsamte Umsatz durch Enzymüberproduktion ausgeglichen. Die Benzoat-Dioxygenase besitzt eine ähnliche Umsatz- und Angriffsspezifität wie die in Alcaligenes eutrophus. Im Vergleich dazu hat Pseudomonas putida (arvilla) mt2 eine weitgehend unspezifische Benzoat-Dioxygenase, mit der die polaren Substituenteneinflüsse ohne Verfälschung durch sterische Faktoren sichtbar werden.

4. Dehydrierung von 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure

JOHNSON und STANIER (1971) isolierten eine Mutante von Alcaligenes eutrophus, die nicht mehr auf Benzoat zu wachsen vermag. Beim Wachstum auf Succinat akkumulierte sie in Gegenwart von Benzoat ein bis dahin unbekanntes Intermediat, das

REINER und HEGEMAN (1971) als 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure identifizierten. Dieses Intermediärprodukt wird durch eine Dehydrogenase zum Brenzcatechin rearomatisiert. Wie REINER (1971) an Acinetobacter, Alcaligenes, Azotobacter und drei Pseudomonas-Arten zeigen konnte, tritt diese Verbindung offensichtlich allgemein als Intermediat bei der Umwandlung von Benzoat zum Brenzcatechin auf. REINER (1972) konnte die Dehydrogenase aus Alcaligenes eutrophus bis zur Homogenität anreichern.

4.1. Anreicherung der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktase aus Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas Stamm B 13

Die Dehydrogenasen aus Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas Stamm B 13 wurden mit den unter METHODEN 15. beschriebenen Schritten angereichert. Die Chromatographie an DEAE-Cellulose wurde im Unterschied zu REINER (1972) mit einem NaCl-Gradienten durchgeführt. Die Aktivitäten in den Säuleneluaten konnten deshalb direkt bestimmt werden, da NaCl in einer Konzentration von 2o mM die DHB-Dehydrogenasen nicht hemmte, während mit $(NH_4)_2SO_4$ in gleicher Konzentration nur noch eine Restaktivität von 2o% gefunden wurde. Die Enzyme aus Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas Stamm B 13 besaßen die gleiche Empfindlichkeit gegenüber NaCl und $(NH_4)_2SO_4$.

Die Abbildungen 6, 7 und 8 zeigen typische Elutionsdiagramme der Chromatographie der drei verschiedenen Extrakte an DEAE-Cellulose.

Die DHB-Dehydrogenase aus Alcaligenes eutrophus wurde schon bei einer NaCl-Konzentration von o,15 M von der Säule eluiert, die aus Pseudomonas Stamm B 13 hingegen erst bei o,23 M. Sowohl nach Anzucht auf Benzoat als auch auf 3-Cl-Bzt konnte beim letzten nur eine DHB-Dehydrogenase isoliert werden. Wie Abbildung 6 deutlich macht, konnte aus Alcaligenes eutrophus ein Pyrocatechase-freies Dehydrogenase-Präparat gewonnen wer-

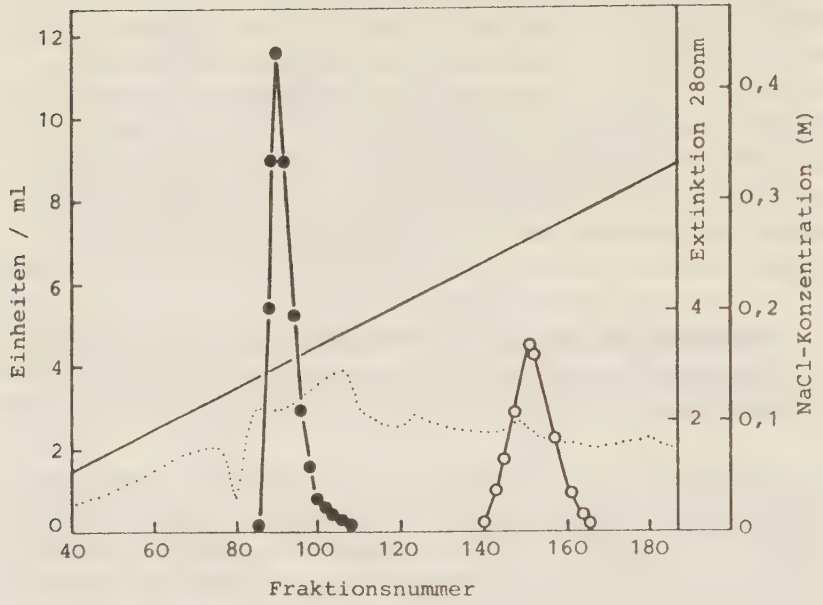


Abb.6 DEAE-Cellulose-Chromatographie der DHB-Dehydrogenase aus Alcaligenes eutrophus

Das Austauschermaterial wurde mit 14 ml einer 56,9 mg/ml enthaltenden Enzymlösung überschichtet und mit 2oo ml Tris/HCl-Puffer (2o mM, pH 8,o) gewaschen. Anschließend wurden die Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten (o - o,5 M NaCl in 2o mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,o) von der Säule (2,5 cm Ø, Säulenbett 38 cm) eluiert. Das Volumen der Fraktionen betrug 5,o5 ml. Die Aktivität wurde, wie unter METHODEN 12.1. beschrieben, bestimmt.
●—● DHB-Dehydrogenase, o——o Pyrocatechase, ——— NaCl, ····· Protein, gemessen an der UV-Absorption bei 28o nm

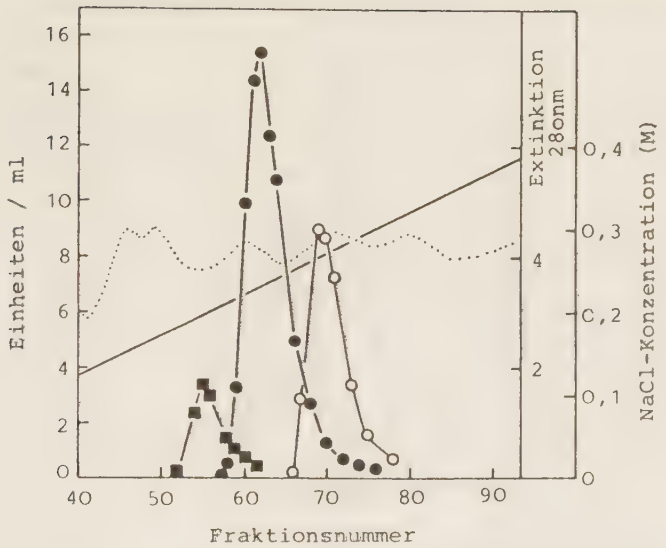


Abb.7 DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie der DHB-Dehydrogenase aus Pseudomonas Stamm B 13 nach Anzucht der Zellen auf 3-Chlorbenzoat

Die DEAE-Cellulose war gegen 2o mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,o, äquilibriert worden. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 135o mg in 3o ml. Mit 2oo ml des oben genannten Puffers wurde das Protein gewaschen. Unter Verwendung eines linearen NaCl-Gradienten (o - o,5 M NaCl) wurden die Enzyme von der Säule eluiert (2,5 cm Ø, 4o cm Säulenbett). Die mittlere Durchflußrate betrug bei Fraktionen von 8 ml 16 ml/Std.. Die Aktivitäten wurden mit den unter METHODEN 12.1. u. 12.3. beschriebenen Tests bestimmt.
●—● DHB-Dehydrogenase, o——o Pyrocatechase+, ■—■ Chlorpyrocatechase+, ——— NaCl, ····· Protein, gemessen an der UV-Absorption bei 28o nm
+ Daten übernommen von DORN (1976)

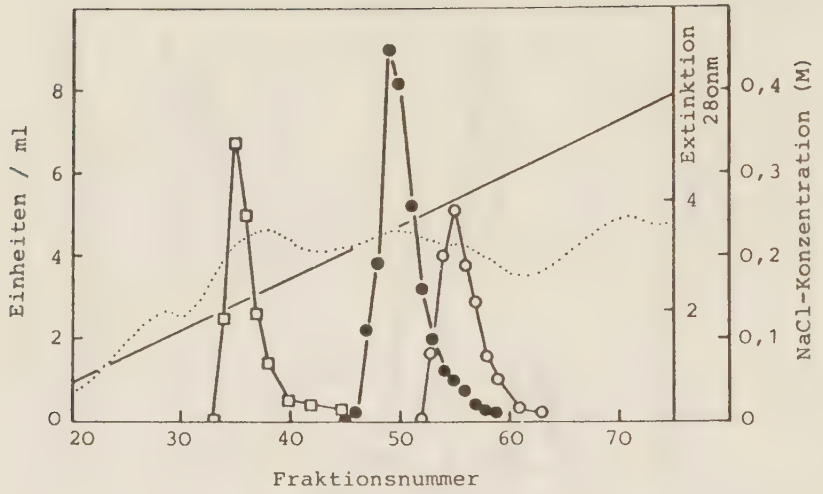


Abb.8 DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie der DHB-Dehydrogenase aus Pseudomonas Stamm B 13 nach Anzucht der Zellen auf Benzoat

Die DEAE-Cellulose war gegen 2o mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,o, äquilibriert worden. Das adsorbierte Protein (128o mg) wurde mit dem genannten Puffer (2oo ml) gewaschen und anschließend mit einem linearen NaCl-Gradienten (o - o,5 M NaCl) vom Austauscher eluiert (2,5 cm Säulendurchmesser, 4o cm Säulenbett). Es wurden Fraktionen von 1o ml bei einer mittleren Durchflußrate von 2o ml/Std. gesammelt. Die Aktivitäten wurden mit den unter METHODEN 12.1. u. 12.3. beschriebenen Testansätzen bestimmt.

●—● DHB-Dehydrogenase, o—o Pyrocatechase+, □—□ Lactonase+, ——— NaCl, ····· Protein, gemessen an der UV-Absorption bei 28o nm

\+ Daten übernommen von DORN (1976)

den. Die DHB-Dehydrogenase aus Pseudomonas Stamm B 13 konnte sowohl nach Anzucht der Zellen auf Benzoat als auch 3-Cl-Bzt nur schwer von Pyrocatechase-Aktivität befreit werden. Beim einen erschien sie im Eluat zwischen den beiden Pyrocatechase-Aktivitäten (vergl. DORN, 1976), beim anderen Mal unmittelbar vor der "normalen" Pyrocatechase.

Die Reste an Pyrocatechase ließen sich auch durch nachfolgende Gel-Filtration mit Sephadex G-2oo nicht von der DHB-Dehydrogenase abtrennen, wie Abbildung 9 zeigt.

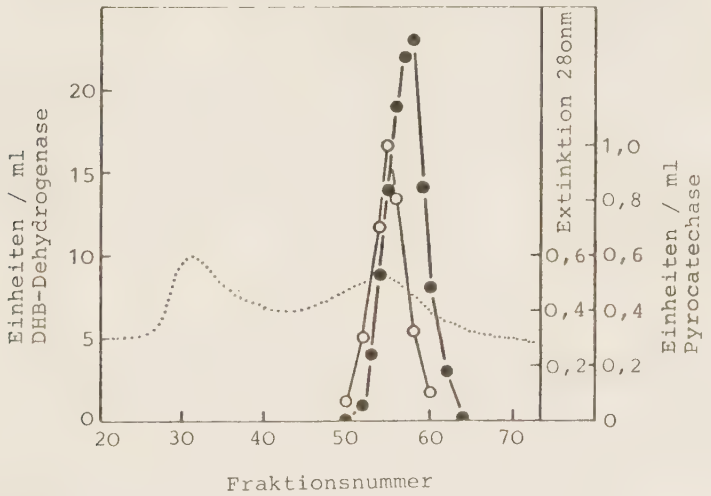


Abb.9 Sephadex G-2oo-Gelfiltration der DHB-Dehydrogenase aus Pseudomonas Stamm B 13 (Anzucht auf 3-Chlorbenzoat)

Das Gel war gegen 2o mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,o, äquilibriert worden. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 14o mg in 1o ml. Eluiert wurde mit dem beschriebenen Puffer mit einer Durchflußrate von 3 ml/Std.(2,5 cm Säulendurchmesser, 78 cm Säulenbett). Die Fraktionen hatten ein Volumen von 3 ml. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten mit den unter METHODEN 12.1. u. 12.3. angegebenen Testansätzen.
●——● DHB-Dehydrogenase, o——o Pyrocatechase, ····· Protein, gemessen an der UV-Absorption bei 28o nm.

Die Tabellen 8a, 8b und 8c fassen die Anreicherungsschritte zur Reinigung der DHB-Dehydrogenasen zusammen.

Auch über längere Zeiträume waren die Aktivitäten der gereinigten Enzyme gleichbleibend hoch. Die Proteine ließen sich mehrfach einfrieren und auftauen und blieben auch in verdünnten Lösungen stabil.

Tab.8a Anreicherung der DHB-Dehydrogenase aus Alcaligenes eutrophus (Anzucht auf Benzoat)

Fraktion	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	spez.Akt. (E/mg Protein)	Gesamtaktivität (E)	Anreicherungsfaktor	Ausbeute (%)
Rohextrakt	38,5	67,8	o,4	1o45	1	1oo
1oo.ooo g	32,o	48,1	o,58	918	1,45	88
$(NH_4)_2SO_4$-Fällung	14,o	56,9	o,582	48o	1,45	46
DEAE-Cellulose	15,5	3,33	5,13	27o	12,8	26
Sephadex G-2oo	2,4	5,1+	14,35	18o	36	17

+ Proteinbestimmung durch Messung der optischen Dichte bei 28o nm

Tab.8b Anreicherung der DHB-Dehydrogenase aus Pseudomonas Stamm B 13 (Anzucht auf 3-Chlorbenzoat)

Fraktion	Volumen (ml)	Protein (mg/ml)	spez.Akt. (E/mg Protein)	Gesamt-aktivität (E)	Anreicherungs-faktor	Ausbeute (%)
Rohextrakt	5o	55,8	o,398	111o	1	1oo
1oo.ooo g	44	43,1	o,584	1132	1,47	1o2
$(NH_4)_2SO_4$-Fällung	31	44,8	o,584	874	1,47	79
DEAE-Cellulose	11	14,2	4,35	7oo	1o,9	63
Sephadex G-2oo	2,6	2,69+	39,4	29o	99	26

Tab.8c Anreicherung der DHB-Dehydrogenase aus Pseudomonas Stamm B 13 (Anzucht auf Benzoat)

Rohextrakt	5o	57,o	o,26	745	1	1oo
1oo.ooo g	39	41,4	o,37	61o	1,42	82
$(NH_4)_2SO_4$-Fällung	32,5	4o,8	o,375	51o	1,44	69
DEAE-Cellulose	1o,6	15,13	1,52	25o	5,85	33
Sephadex G-2oo	2,25	1,37+	59,5	188	229	25

+ Proteinbestimmung durch Messung der Extinktion bei 28o nm

4.2. Eigenschaften der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktasen

4.2.1. pH-Optimum des Enzymes aus Pseudomonas Stamm B 13

Die Abhängigkeit der Dehydrierung des DHB zum Brenzcatechin von der Wasserstoffionenkonzentration wurde unter Standardbedingungen im 2o mM Tris/HCl-Puffer für die DHB-Dehydrogenase aus Pseudomonas Stamm B 13 bestimmt. Wie das Aktivitätsprofil in Abbildung 1o zeigt, ergab sich ein Optimum bei pH 8,4.

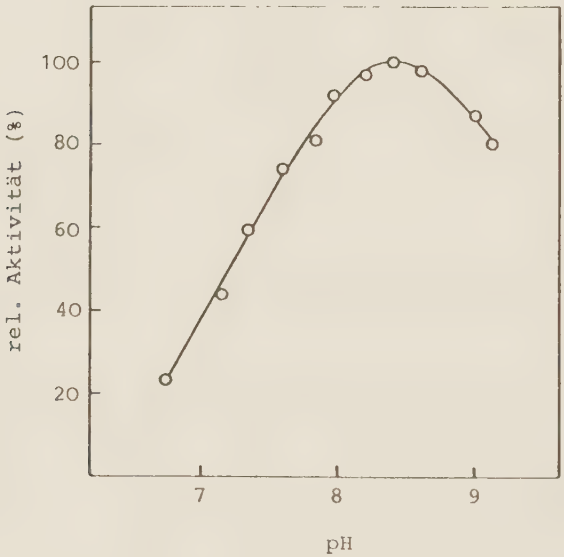


Abb. 1o Abhängigkeit der Reaktionsrate der DHB-Dehydrogenase aus Pseudomonas Stamm B 13 von der Wasserstoffionen-Konzentration

Reaktionsansatz und weitere Angaben siehe unter METHODEN 12.1. und Text

Die DHB-Dehydrogenase aus Alcaligenes eutrophus besitzt ein pH-Optimum bei pH 8,o (REINER, 1972).

Die kinetischen Messungen wurden anschließend beim jeweiligen pH-Optimum durchgeführt.

4.2.2. Bestimmung des K_m-Wertes für NAD^+ des Enzymes aus Pseudomonas Stamm B 13

Zur Aufnahme der Sättigungskurve wurde die Konzentration von NAD^+ im Bereich o,o4 - o,4 mM variiert. Die anderen Reaktionskomponenten wurden konstant gehalten. Aus der Lineweaver-Burk-Auftragung ergab sich ein K_m-Wert von o,67 mM.

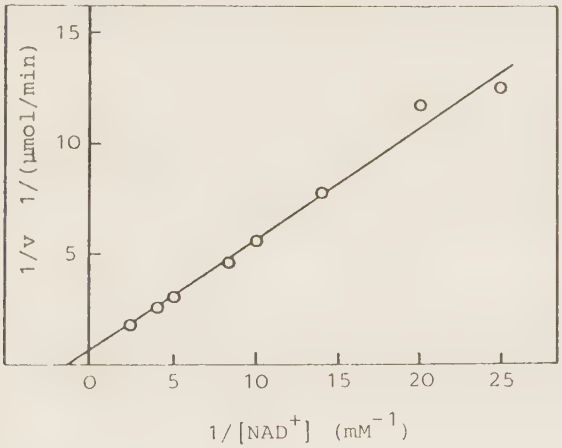


Abb.11 Abhängigkeit der Aktivität der DHB-Dehydrogenase von der NAD^+-Konzentration (Lineweaver-Burk-Auftragung)

Testansatz und weitere Angaben siehe unter METHODEN 12.1. und im Text; eingesetzte Menge Enzym: 5o µl, entsprechend 1o µg Prot.

REINER (1972) fand für die DHB-Dehydrogenase aus Alcaligenes eutrophus bei pH 8,o einen K_m-Wert von o,15 mM und 1,o mM bei pH 9,6.

4.2.3. Bestimmung von Substituenteneinflüssen auf die Dehydrierung von 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure

Im Gegensatz zu den enzymatischen Reaktionen mit aromatischen Substraten können beim Umsatz der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren Halogensubstituenten nicht in konjugative Wechselwirkung mit dem Angriffspunkt des Enzymes treten.

Es galt zu prüfen, ob der Umsatz der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren durch die Substituenten beeinflußt oder sogar, wie im Falle der Benzoat-Dioxygenase, kritisch verlangsamt wird.

4.2.3.1. Affinität der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure-Oxidoreduktasen zu substituierten Substraten

Die K_m-Werte, welche gewissermaßen die Affinität der DHB-Dehydrogenasen zu den Substraten angeben, wurden für die verschiedenen, substituierten Substrate ermittelt, indem die Substratkonzentration im Bereich von o,o4 - 1,6 mM variiert wurde.

Da die kristallinen Natriumsalze der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren wechselnde Mengen Kristallwasser enthielten, wurde die eingesetzte Substratmenge durch ihren vollständigen Umsatz und der dabei gebildeten äquivalenten Menge $NADH_2$ kontrolliert.

Die K_m-Werte, die durch Lineweaver-Burk-Auftragung ermittelt wurden, sind in der Tabelle 9 wiedergegeben.

Mit der DHB-Dehydrogenase, die Pseudomonas Stamm B 13 beim Wachstum auf Benzoat synthetisiert, wurden die K_m-Werte für 3-Cl-, 5-Cl-, 3-Br-, 5-Br- und 3-CH_3-DHB bestimmt. Sie korrelieren mit den Werten, die mit der DHB-Dehydrogenase bei Anzucht auf 3-Cl-Bzt erhalten wurden.

Die Dehydrogenasen aus Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas Stamm B 13 besitzen zu Substraten mit Substituenten in 3-

Tab.9 Affinität der DHB-Dehydrogenasen aus Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas Stamm B 13 zu substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren (DHB)

Substrat	K_m (mM) (a)	K_m (mM) (b)
DHB	o,16	o,16
3-F-DHB	o,22	o,3
3-Cl-DHB	o,1	o,o7
3-Br-DHB	o,12	o,o3
3-CH_3-DHB	o,17	o,o9
4-F-DHB	o,6	1,3
4-Cl-DHB	6,3	14,3
4-CH_3-DHB	1,8	1,4
5-F-DHB	o,33	o,45
5-Cl-DHB	o,13	o,12
5-Br-DHB	o,16	o,o8
5-CH_3-DHB	o,16	o,o6
6-F-DHB	o,13	o,1

Die Tests (s. METHODEN 12.1.) wurden bei Raumtemperatur mit
a) 36fach angereichertem Enzym aus Alcaligenes eutrophus nach Anzucht der Zellen auf Benzoat
b) der 1oofach angereicherten DHB-Dehydrogenase aus Pseudomonas Stamm B 13, der auf 3-Chlorbenzoat angezogen wurde,
im 2o mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,o Alcaligenes eutrophus und pH 8,4 Pseudomonas Stamm B 13, durchgeführt. Die Substrate wurden wie angegeben variiert.

oder 5-Stellung eine gleich große oder sogar größere Affinität als zum natürlichen Substrat. Die Ausnahmen bilden die Substrate mit Fluorsubstituenten, die sehr viel schlechter gebunden werden.

Auffallend sind die gegenüber dem unsubstituierten Substrat sehr viel größeren K_m-Werte der in 4-Stellung substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren. Sterische Faktoren können dies allein nicht erklären, da der kleinere Chlorsubstituent geringere Affinität als die Methylgruppe verursacht.

Signifikante Unterschiede für die Enzyme aus Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas Stamm B 13 traten nicht auf. Die Affinität zu 3- und 5-substituierten Substraten ist für das Enzym aus Pseudomonas Stamm B 13 jedoch gering größer. Die Ausnahmen sind die Substrate mit Fluorsubstituenten.

Für die Anheftung des Substrates an das Enzym muß die Carboxylgruppe notwendig sein, da mit dem Methylester bei einer Konzentration von 1 mM keine $NADH_2$-Bildung beobachtet wurde. Der Umsatz des DHB wurde durch den Methylester in äquimolarer Konzentration von 1 mM nicht gehemmt.

Mit der 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure konnte ebenfalls weder eine Umsatzhemmung noch eine $NADH_2$-Bildung festgestellt werden.

4.2.3.2. Messung der maximalen Umsatzgeschwindigkeiten substituierter 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Bei Substratsättigung wurden die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten der verschieden substituierten Substrate bestimmt.

Die relativen Umsatzgeschwindigkeiten, bezogen auf DHB gleich 1oo, sind in Tabelle 1o zusammengefaßt.

Tab.1o Relative maximale Umsatzgeschwindigkeiten der DHB-Dehydrogenasen aus Alcaligenes eutrophus (Benzoat gezogen) und Pseudomonas Stamm B 13 (3-Chlorbenzoat gezogen) mit substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren (DHB)

Substrat	v_{max} rel. (a)	v_{max} rel. (b)
DHB	1oo	1oo
3-F-DHB	56	78
3-Cl-DHB	16	43
3-Br-DHB	9	25
3-CH_3-DHB	25	46
4-F-DHB	1oo	9o
4-Cl-DHB	32	3o
4-CH_3-DHB	52	31
5-F-DHB	48	68
5-Cl-DHB	95	75
5-Br-DHB	68	76
5-CH_3-DHB	14	42
6-F-DHB	86	91

Die v_{max}-Werte wurden bei Substratsättigung (s. Tab.9) mit den Extrakten ermittelt, die nach Gel-Filtration mit Sephadex G-2oo gewonnen wurden (s. Tab.8). Gemessen wurde bei Raumtemperatur. Angegeben sind die relativen maximalen Umsatzgeschwindigkeiten, bezogen auf DHB gleich 1oo. Reaktionsansatz siehe METHODEN 12.1.
(a) Extrakt aus Alcaligenes eutrophus
(b) Extrakt aus Pseudomonas Stamm B 13

Bezüglich der untersuchten Substrate 3-Cl-, 5-Cl-, 3-Br-, 5-Br- und 3-CH_3-DHB verhalten sich die Enzympräparate unabhängig davon, ob Pseudomonas Stamm B 13 auf Benzoat oder 3-Cl-Bzt angezogen wurde.

Die relativen Umsatzraten für substituierte Substrate zeigen für die Enzyme aus Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas Stamm B 13 keine signifikanten Unterschiede. So werden durch beide Enzyme die 5-substituierten Substrate schneller als die 3-substituierten umgesetzt; der Unterschied ist jedoch bei Pseudomonas Stamm B 13 nicht so ausgeprägt. Für die Verwertung von 3-Cl-Bzt ist dies von Vorteil, da, wie unter 3.2. gezeigt, mehr 3- als 5-substituiertes DHB durch die Benzoat-Dioxygenase gebildet wird.

Obwohl ein beträchtlicher Unterschied zwischen den K_m-Werten der 3- und 5-substituierten Substrate auf der einen Seite und den der 4-substituierten auf der anderen vorhanden ist, sind die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten der drei isomeren Substrate praktisch gleich.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, werden die gegenüber DHB geringeren Umsatzraten für 3-Cl- und 5-Cl-DHB beim Wachstum auf 3-Cl-Bzt durch höhere Aktivität der DHB-Dehydrogenase, d.h. durch eine Überproduktion an Enzym ausgeglichen.

4.3. Konformationsanalyse der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Für die Bewertung der unter 4.2.3.1. und 4.2.3.2. beschriebenen Affinitäten und maximalen Umsatzraten der substituierten Substrate war zu prüfen, ob die gefundenen Werte nur auf den gesuchten Substituenteneffekten beruhen, oder ob sie Konformationsänderungen des nicht-planaren Cyclohexadien-Ringes widerspiegeln, die durch den Substituenten verursacht werden.

Wird linear polarisiertes Licht, das aus gleichen Anteilen

rechts- und links-circular-polarisiertem Licht zusammengesetzt ist, durch ein chirales Medium geschickt, so absorbieren die Chromophore in Abhängigkeit von ihrer molaren Umgebung entweder den rechts- oder links-polarisierten Anteil stärker. Die Abhängigkeit der Differenz der Extinktionskoeffizienten für rechts- und links-polarisiertes Licht von der Wellenlänge wird als Circular-Dichroismus (CD) registriert.

Wenngleich man aus einem CD-Spektrum allein die absolute Konfiguration nicht ablesen kann (ZIFFER et al., 1973), sollte der Vergleich der Spektren doch entscheiden lassen, ob die Chiralität des Dienchromophores der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren übereinstimmen. Da angenommen werden darf, daß nur ein cis-Enantiomer durch die Benzoat-Dioxygenase gebildet wird, sind nur zwei mögliche Konformere zu diskutieren.

Die gewonnenen Daten erlauben den Schluß, daß bei allen untersuchten substituierten Substraten die gleiche Konformation wie beim natürlichen Substrat vorliegt. Bei allen Substraten tritt zwischen 25o und 32o nm ein negativer chiroptischer Effekt des Dienchromophores auf, siehe die Abbildungen 28 - 32 im ANHANG.

Die Ergebnisse zeigen, daß die DHB-Dehydrogenasen aus Alcaligenes und Pseudomonas Stamm B 13 sich bezüglich der Affinität und den Umsatzraten mit substituierten Substraten kaum unterscheiden. Pseudomonas Stamm B 13 bildet auf Benzoat und 3-Chlorbenzoat das gleiche Enzym. Bei Anzucht auf 3-Chlorbenzoat wird der durch die Substituenten verlangsamte Umsatz durch Verdopplung der Enzymproduktion ausgeglichen.

Die DHB-Dehydrogenase wird durch Halogensubstituenten nicht kritisch verlangsamt.

5. Präparation substituierter 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Die substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren wurden, wie unter METHODEN 16.1. beschrieben, mit der Mutante Alcaligenes eutrophus B 9 aus den entsprechenden Benzoaten hergestellt. Wegen der Enzymspezifität war die Zahl der in präparativen Mengen (> 1o mg) zugänglichen Verbindungen eingeschränkt. Während die Verbindungen 3-Cl-, 5-Cl-, 3-Br-, 5-Br-, 3-CH_3-, 3-F-, 4-F-, 5-F-, 6-F-DHB und DHB in größerer Menge leicht darstellbar waren, konnten 4-Cl-, 3,5-diCl-, 4-CH_3- und 5-CH_3-DHB nur mit erheblichem Aufwand und geringer Ausbeute isoliert werden.

Um o,2 mmole des 4-Chlorbenzoates zu oxygenieren, mußte die Zellmenge eines 1ol-Fermenters (8,5 g Naßgewicht Zellen) eingesetzt werden.

Bei meta-substituierten Benzoaten traten erwartungsgemäß zwei isomere Produkte auf, die nur als Methylester auf präparativen Kieselgel-Schichten getrennt werden konnten.

Vor der Trennung auf präparativen Schichten mußte die Hauptmenge des 3-CH_3-DHB, das zum überwiegenden Teil aus 3-CH_3-Bzt gebildet wurde, als Methylester durch Kristallisation aus Benzin (4o/6o) abgetrennt werden; erst dann konnten die Isomeren nach 4maligem Entwickeln der Platten vollständig getrennt werden.

Die Natriumsalze ließen sich dann aus den Methylestern durch Esterspaltung nach CLAISEN (19o5) gewinnen.

Schließlich standen 12 substituierte 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren als Substrate der DHB-Dehydrogenase zur Verfügung.

6. Eigenschaften der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Da die freien Säuren instabil waren und ihre Salze mit wechselnden Mengen Kristallwasser kristallisierten, wurden zur Identifizierung die Methylester bzw. bei schlecht kristallisierbaren Substanzen die 1,2-Diacetoxyderivate der Methylester herangezogen.

6.1. Chromatographische Eigenschaften

Das chromatographische Verhalten der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren und ihren Derivaten wurde auf DC-Fertigplatten an mehreren Fließmittelsystemen untersucht. Die R_f-Werte sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tab.11 R_f-Werte der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren und ihren Derivaten

	R_f-Werte x 1oo				
	freie Säure	Methylester		1,2-Diacetoxy-derivat des Methylesters	
	(A)	(B)	(C)	(C)	(D)
DHB	3	21	8	29	15
3-F-DHB	5			32	23
4-F-DHB	7			33	22
5-F-DHB	6			29	13
6-F-DHB	8			31	21
3-Cl-DHB	8	29	18		
4-Cl-DHB	1o	28	15		
5-Cl-DHB	1o	25	13		
3,5-diCl-DHB	2o	34	28		
3-Br-DHB	8	31	18		
5-Br-DHB	11	26	13		
3-CH_3-DHB	5	28	12		
4-CH_3-DHB	4	26	9		
5-CH_3-DHB	4	25	8		

(A) Diisopropyläther/Ameisensäure/Wasser 14o/7/3
(B) Chloroform/Aceton 8o/2o
(C) Diisopropyläther
(D) Methylenchlorid/Benzin (4o/6o) 8o/2o
Die Entwicklung erfolgte bei Kammersättigung nach der aufsteigenden Methode. Laufstrecke: 17 cm, Entwicklungsdauer: (A) 12o min, (B) 7o min, (C) 5o min, (D) 5o min. Schichten siehe METHODEN 17.1.

6.2. NMR-Spektren

Die bei der Strukturaufklärung des Grundkörpers (REINER und HEGEMAN, 1971) ermittelten Daten wiesen schon auf die Komplexität der auftretenden Signale hin. So traten alle Protonen am Dien in einem schmalen Bereich in Resonanz und bildeten ein Multiplett. Nur das allylische Proton trat bei kleinerem δ-Wert allein in Resonanz.

Bei den vorliegenden Spektren der Methylester lassen sich Signale der Methylprotonen der Estergruppe, des allylischen Protons und der Methylprotonen einer Seitengruppe leicht zuordnen, da sie in allen Spektren bei gleicher chemischer Verschiebung aufzufinden sind und auch die Lage der Signale den üblichen δ-Werten entsprechen.

Die breiten Signale lassen sich den Hydroxyl-Protonen zuordnen, da sie mit D_2O austauschbar sind, was am Beispiel der 3-CH_3-DHB nachgewiesen wurde.

Eine weitere Zuordnung der Protonen zu bestimmten Signalen allein aufgrund der chemischen Verschiebung bzw. eine Analyse der Kopplungen ist wegen der geringen Frequenzunterschiede der Vinyl- und Allyl-Protonen nicht leicht durchführbar.

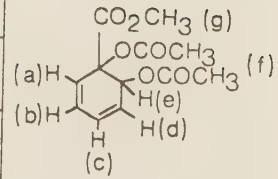
Bei den 1,2-Diacetoxyderivaten der Methylester wird das allylische Proton durch das Multiplett der Dienprotonen verdeckt. Hier lassen sich nur die Protonen der Estergruppe sowie die der Acetoxygruppe eindeutig Signalen zuordnen.

Bei den 1,2-Diacetoxyderivaten der Methylester mit einem Fluorsubstituenten verstärkt sich die Komplexität der auftretenden Multipletts noch zusätzlich durch das Auftreten von Proton-Fluor-Kopplungen.

Wegen der Komplexität der allylischen und vinylischen Protonensignale kann eine eindeutige Zuordnung der 3- bzw. 5-substituierten Isomeren nicht getroffen werden.

Tab.12 Auswertung der NMR-Spektren

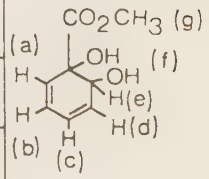
	H(a)+H(b)+H(c)+H(d)+H(e)	H(f)	H(g)
DHB	5,9-6,33 (4H,m) 4,68-5,9 (1H,m)	2,o7 (3H,s) 2,1o (3H,s)	3,73 (3H,s)
	H(a)+H(b)+H(c)+H(e)	H(f)	H(g)
3-F-DHB	5,53-6,38 (4H,m)	2,14 (3H,s) 2,16 (3H,s)	3,78 (3H,s)
	H(a)+H(b)+H(d)+H(e)	H(f)	H(g)
4-F-DHB	6,o2-6,18 (3H,m) 5,41 (1H,ddm)	2,o6 (3H,s) 2,1o (3H,s)	3,74 (3H,s)
	H(a)+H(c)+H(d)+H(e)	H(f)	H(g)
5-F-DHB	6,o8 (1H,s) 5,7-6,o2 (3H,m)	2,o5 (3H,s) 2,o8 (3H,s)	3,71 (3H,s)
	H(b)+H(c)+H(d)+H(e)	H(f)	H(g)
6-F-DHB	5,64-6,2 (4H,m)	2,o9 (3H,s) 2,16 (3H,s)	3,81 (3H,s)



[1] H-NMR-Spektren in $CDCl_3$; chemische Verschiebung angegeben in δ (ppm);Erläuterung zu den Klammern: (Zahl der Protonen, Art des Signales); verwendete Abkürzungen: (s) Singulett, (d) Dublett, (t) Triplett, (q) Quartett, (dd) doppeltes Dublett, (dq) doppeltes Quartett, (m) Multiplett, (b) breit.

Fortsetzung Tab.12

	H(a)+H(b)+H(c)+H(d)	H(e)	H(f)	H(g)	
DHB	5,98-6,2o (1H,m) 5,66-5,95 (3H,m)	4,8o (1H,db)	3,92 (1H,s) 3,48 (1H,db)	3,82 (3H,s)	
	H(a)+H(b)+H(c)	H(e)	H(f)	H(g)	H(h)
3-CH_3-DHB	5,94-6,15 (1H,q) 5,53-5,81 (2H,m)	4,67 (1H,sb)	3,68 (1H,sb) 2.82 (1H,sb)	3,86 (3H,s)	1,9o (3H,s)
3-Cl-DHB	5,94-6,18 (2H,m) 5,6-5,8 (1H,m)	4,74 (1H,s)	3,12 (1H,sb)	3,88 (3H,s)	
3-Br-DHB	6,38 (1H,dq) 5,7-6,1 (2H,m)	4,79 (1H,sb)	3,o6 (1H,sb) 3,78 (1H,db)	3,9o (3H,s)	
	H(a)+H(c)+H(d)	H(e)	H(f)	H(g)	H(h)
5-CH_3-DHB	5,79 (2H,s) 5,47 (1H,m)	4,79 (1H,sb)	3,oo (1H,sb) 3,65 (1H,sb)	3,84 (3H,s)	2,o2 (3H,s)
5-Cl-DHB	5,8-5,92 (3H,m)	4,84 (1H,s)	2,93 (1H,sb)	3,88 (3H,s)	
5-Br-DHB	5,7-6,14 (3H,m)	4,85 (1H,sb)	2,99 (1H,sb)	3,89 (3H,s)	
	H(a)+H(c)	H(e)		H(g)	
3,5-diCl-DHB	6,11 (1H,t) 5,8 (1H,m)	4,77 (1H,m)		3,91 (3H,s)	



H(h) Methylgruppe als Substituent

6.3. Zuordnung der 3- und 5-Substitutionsisomeren der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Wie DORN (1976) zeigen konnte, werden 3- und 4-substituierte Brenzcatechine durch die "normale" Pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B 13, die beim Wachstum auf Benzoat gebildet wird,

Tab.13 Zuordnung der 3- und 5-substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren durch Überführung in Brenzcatechine und Bestimmung der relativen Ringspaltungsgeschwindigkeiten

eingesetztes Substrat		rel. Aktivität der Pyrocatechase
DHB[+]	Cat	in % (bezogen auf Cat=1oo)
	Cat	1oo[++]
	3-Cl-Cat	o,7[++]
	4-Cl-Cat	11,3[++]
3-Cl-DHB	(3-Cl-Cat)	o,o7
5-Cl-DHB	(4-Cl-Cat)	3,5
	3-CH_3-Cat	11[++]
	4-CH_3-Cat	92[++]
3-CH_3-DHB	(3-CH_3-Cat)	6,5
6-F-DHB	(3-F-Cat)	o,4
4-F-DHB	(4-F-Cat)	2o,2
3-F-DHB	(3-F-Cat)	o,3
5-F-DHB	(4-F-Cat)	18,3

[+] Beim Einsatz von substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren wurde mit DHB-Dehydrogenase aus Alcaligenes eutrophus vorinkubiert, Ansatz s. METHODEN 14., und die relativen Umsatzgeschwindigkeiten der entstandenen substituierten Brenzcatechine, in Klammern angegeben, durch Zugabe von Pyrocatechase aus Pseudomonas Stamm B 13 bestimmt.

[++] Daten übernommen von DORN (1976)

unterschiedlich schnell gespalten. Aufgrund dieser Tatsache ließen sich die 3- und 5-Isomeren der Chlor-, Methyl- und Fluor-DHB eindeutig zuordnen, nachdem sie enzymatisch in die entsprechenden Brenzcatechine (Cat) umgewandelt wurden. Da keine authentischen Fluorbrenzcatechine zur Verfügung standen, wurden entsprechende Standards aus 6-F- und 4-F-DHB durch Dehydrierung hergestellt.

6.4. UV-Spektren

Die UV-Absorptionsdaten der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren sind in Tabelle 14 zusammengefaßt. Sie werden vergleichend diskutiert.

Die Stärke der Rotverschiebung des Dienchromophores nimmt in der Reihenfolge: $Br > Cl > CH_3 \geq F$ ab.

Entsprechendes beobachtete MATSEN (195o) bei monosubstituierten Benzolen, das er mit den mesomeren Effekten der Substituenten deutete.

Die bathochrome Verschiebung des Chromophores zeigt weiter eine Abhängigkeit von der Stellung des Substituenten am Diensystem.

STAAB (196o) wies auf Ergebnisse hin, die zeigen, daß Alkylgruppen an den Enden eines konjugierten Systems stärker bathochrom wirken als Substituenten in der Mitte der Konjugationskette.

Bei den 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren haben Substituenten in 3-Stellung, also am Ende des konjugativen Systems, die größte Wirkung auf die bathochrome Verschiebung, während sie über die 4- zur 5-Stellung abnimmt.

Daß eine "Cross-Conjugation" (YOUNG et al., 1969a; 1969b) zu geringen bathochromen Effekten beiträgt, läßt sich aus den UV-Daten der 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoesäure (λ_{max} 278nm, ε 815o) und der 3,4-Dihydro-3,4-dihydroxybenzoesäure

Tab.14 UV-Absorptionsdaten der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Methylester von	λ_{max} (nm)	ε	bathochromer (+) bzw. hypsochromer (-) Effekt (nm)
DHB	26o,5	31oo	/
3-Cl-DHB	273	56oo	+12,5
4-Cl-DHB	265	n.b.	+ 4,5
5-Cl-DHB	264	29oo	+ 3,5
3,5-diCl-DHB	276	44oo	+15,5
3-Br-DHB	277	64oo	+16,5
5-Br-DHB	266	26oo	+ 5,5
3-CH_3-DHB	268	52oo	+ 7,5
4-CH_3-DHB	264	n.b.	+ 3,5
5-CH_3-DHB	26o,5	n.b.	o
Methylester der Diacetoxyderivate von			
DHB	26o,5	39oo	/
3-F-DHB	267,5	355o	+ 7,o
4-F-DHB	264	355o	+ 3,5
5-F-DHB	258	37oo	- 2,5
6-F-DHB	266	36oo	+ 5,5

Die Spektren wurden in Methanol "Uvasol" aufgenommen.
n.b. nicht bestimmt, da Öle.

(λ_{max} 272nm, ε 225o) (YOUNG et al., 1969a; 1969b) ablesen. Die Konjugation des Diensystems mit der Carboxylgruppe ist beim ersten wirksamer als die "Cross-Conjugation" beim zweiten.

Beim 5-F-DHB wird sogar eine Blauverschiebung beobachtet.

RUTNER und BAUER (1964) fanden ebenfalls einen Unterschied bei der Substitution durch Chlor und Fluor. Sie stellten fest, daß Substitution durch Chlor, dessen induktive und mesomere Wirkungen von etwa gleicher Größe sind, stets eine bathochrome Verschiebung bewirkt, wie es schon BOYER (1947) beschrieb; das stark induktiv wirkende Fluor verursachte hingegen eine hypsochrome Verschiebung. LACHNER et al. (195o) zeigten, daß der induktive Effekt des Fluors beim Halomethan eine hypsochrome Verschiebung bewirkt. Wird hingegen bei Äthylenverbindungen ein Wasserstoff durch Fluor ersetzt, so wird eine Absorptionsverschiebung zu längeren Wellenlängen beobachtet. Das wird damit erklärt, daß das Fluor in Resonanz mit der Doppelbindung tritt, und daß der mesomere Effekt gegenüber dem induktiven überwiegt.

Im 5-F-DHB muß demnach der induktive Effekt stärker als der Resonanzeffekt sein, während in den anderen 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren mit Fluorsubstituenten der mesomere Effekt überwiegen muß. Eine Verschiebung der Absorptionsmaxima zu höheren Wellenlängen wird in der folgenden Reihenfolge 3-F-DHB > 6-F-DHB > 4-F-DHB > DHB > 5-F-DHB sichtbar.

Substituenten in 3-Stellung, am Ende der Konjugationskette, bewirken eine sehr große Rotverschiebung, d.h. sie sind besonders stark an der Resonanz des π-Systems des Diens beteiligt. So ist die Rotverschiebung durch Brom, Chlor und Methyl größer als sie nach der von WOODWARD (1942) aufgestellten und von FIESER und FIESER (1959) sowie SCOTT (1964) modifizierten Absorptionsregel für homoannulare Diene zu erwarten wäre. Die gefundenen Ergebnisse stehen im Einklang mit denen, die GIBSON et al. (1968b; 197oa) berichteten. Die Rotverschiebung durch

einen Chlorsubstituenten am Ende des Konjugationssystems beträgt 11 nm, während beim 3-Cl-DHB eine Verschiebung um 12,5 nm gefunden wurde.

Beim 3,5-diCl-DHB addieren sich die Rotverschiebungen der Chlorsubstituenten in 3- und 5-Stellung.

Betrachtet man die Extinktionskoeffizienten, so fällt auf, daß Substituenten in 3-Stellung neben der großen Rotverschiebung eine starke Erhöhung des Extinktionskoeffizienten bewirken, mit der Ausnahme von Fluor.

Substituenten in 5-Stellung rufen neben geringer Verschiebung zu längeren Wellenlängen, aufgrund der "Cross-Conjugation" des Diensystems mit dem Substituenten, einen hypochromen Effekt hervor. Der hyperchrome Effekt beim 3,5-diCl-DHB ist folglich klein, weil der Substituent in 3-Stellung den Extinktionskoeffizienten stark erhöht, während der Substituent in 3-Stellung ihn erniedrigt.

Neben der Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten von der Stellung wird dieser auch durch die Art des Substituenten beeinflußt. So erzeugt in 3-Stellung Brom einen größeren hyperchromen Effekt als Chlor und dieser wiederum als Methyl. In der 5-Stellung erniedrigt hingegen Brom den Extinktionskoeffizienten stärker als Chlor.

6.5. Schmelzpunkte der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

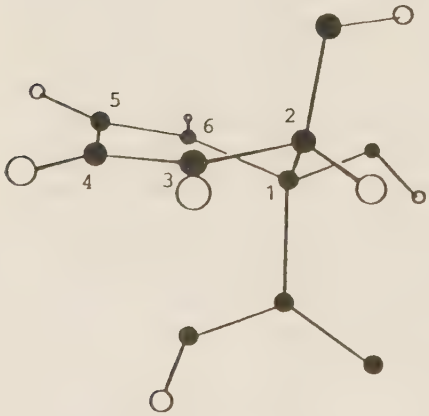
Die Schmelzpunkte der in kristalliner Form gewonnenen Derivate der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren sind in der Tabelle 15 zusammengestellt.

Tab.15 Schmelzpunkte der Methylester und 1,2-Diacetoxymethylester der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

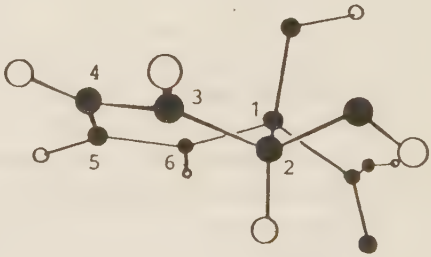
Methylesterderivate	°C unkorrigiert
DHB	51,5 - 52,5
3-Cl-DHB	86 - 87,5
5-Cl-DHB	96,5 - 97
3,5-diCl-DHB	113 - 114
3-Br-DHB	1o2,5 - 1o3,5
5-Br-DHB	1o2,5 - 1o3,5
3-CH_3-DHB	9o - 91
Diacetoxymethylesterderivate	
DHB	91 - 91,5
3-F-DHB	84,5 - 85
4-F-DHB	96 - 96,5
5-F-DHB	12o - 121
6-F-DHB	65 - 66,5

6.6. Circular-Dichroismus der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Der Circular-Dichroismus (CD) ist diejenige optische Eigenschaft, die am stärksten mit der absoluten Stereochemie von Dihydrodiolen verbunden ist. Die chiral-optischen Effekte sind verknüpft mit dem $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang des konjugierten Chromophores des homoannularen cisoiden Diens C=C-C=C, wie MOSCOWITZ et al. (1961), WEISS et al. (1965) und CHARNEY et al. (1965) theoretisch und experimentell zeigen konnten. Die absolute Stereochemie kann jedoch aus einem CD-Spektrum allein nicht abgeleitet werden, da die Dihydrodiole in zwei Konformationen vorliegen können, wobei sich der "skew sense"+ des Diens unterscheidet.



Blick auf die Bindung C_4-C_5



Blick unter die Bindung C_4-C_5

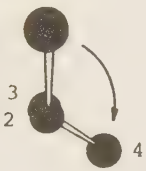
Kohlenstoff
Wasserstoff
Sauerstoff

Konformationen eines cis-Enantiomers der 3,5-Cyclohexa-1,2-diol-1-carbonsäure.

+ "skew sense" muß im Sinne von schräger oder schiefer Sinn, im Gegensatz zu planar verstanden werden, siehe das obige Dreidingmodell des Dihydrodiols.

Hinzu kommt noch, daß in neueren Publikationen darauf hingewiesen wird, daß allylische Hydroxylgruppen (BEECHAM et al., 1971; BEECHAM, 1971) oder allylische axiale Substituenten (BURGSTAHLER und BARKHURST, 197o) die optischen Eigenschaften des $\pi \rightarrow \pi^*$ Überganges tiefgreifend modifizieren. Nach BEECHAM et al. (1971) scheint die Sauerstoff enthaltende Helix die

C=C-C-O



O-C-C=C

vorherrschende dissymmetrische Einheit zu sein, die den Sinn des Cotton-Effektes bestimmt, der mit dem $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang des Diens verknüpft ist.

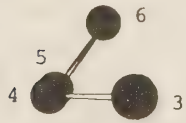
Die Interpretation des CD-Spektrums der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure wird durch den unbekannten Einfluß der allylständigen Carboxylgruppe erschwert. Außerdem sind die chiral-optischen Effekte der C=C-C-O Helices (über die C-Atome 2, 3 und 4 bzw. 1,6 und 5, siehe oben) aufgrund der cis-Konfiguration der 1,2-Diolgruppierung gegensinnig.

Die CD-Spektren der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren (s. ANHANG) können beim gegenwärtigen Erkenntnisstand nicht zur Bestimmung der absoluten Stereochemie des Cyclohexadien-1,2-diol-Systems ausgewertet werden. Dennoch lassen sich wie bei den UV-Spektren gewisse Gesetzmäßigkeiten der Substituenteneinflüsse aufzeigen und Gleichartigkeit der Konformation der substituierten Verbindungen untereinander erkennen.

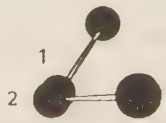
Das CD-Spektrum des DHB ist aus den genannten Gründen komplizierter als diejenigen der trans-Dihydrodiole (BEECHAM et al.,

1971), deren C=C-C-O Helices gleichsinnig sind. Das DHB erzeugt einen negativen Cotton-Effekt bei 285 nm und zwei positive bei 254 und 215 nm, während bei den trans-Dihydrodiolen nur ein Cotton-Effekt, entweder ein positiver oder ein negativer, beobachtet wird.

Werden die Hydroxylgruppen acetyliert, so ändert sich das Spektrum, wie Abbildung 28 zeigt, qualitativ nur im kurzwelligen Bereich. Die Intensitäten der Cotton-Effekte werden durch die Acetylgruppierungen verstärkt. Dies ist damit zu erklären, daß der Winkel zwischen den C-O-Bindungen aufgrund der sterischen Hinderung der beiden Acetylgruppen vergrößert wird. Zwangsläufig wird auch der "skew"-Winkel, den die beiden Doppelbindungen des Diens miteinander bilden, vergrößert, was zu einer höheren optischen Aktivität führt (CHARNEY, 1965).



C=C-C=C



O-C-C-O

Bezüglich des Diensystems nicht endständiges Chlor oder Brom (in 5-Stellung, an der Konjugationskette) beeinflußt das CD-Spektrum im langwelligen Bereich wenig. So werden bei beiden Substitutionsanalogen die Cotton-Effekte, siehe Abbildung 29, mit der gleichen Orientierung und ähnlicher Intensität wie beim Grundkörper bei 285 und 255 nm gefunden. Die Peaks im kurzwelligen Bereich besitzen entgegengesetzte Cotton-Effekte.

Sitzen jedoch Substituenten am Ende der Konjugationskette, also in 3-Stellung, so wird, entsprechend wie beim UV-Spektrum, der negative Cotton-Effekt im langwelligen Bereich beträchtlich verstärkt. Wie aus Abbildung 3o ersichtlich wird, tritt ein negativer Cotton-Effekt von sehr viel höherer Amplitude

auf, der von der Art des Substituenten abhängt. So verursacht Brom einen stärkeren Cotton-Effekt als Chlor, wohingegen Methyl eine geringe Verstärkung bewirkt. Die verschieden starke Beteiligung der Substituenten an der Konjugation des Diensystems beeinflußt gleichermaßen UV- und CD-Spektren. Dieser größere Cotton-Effekt gegenüber dem des DHB kann nicht auf einer Veränderung des "skew"-Winkels beruhen, wie später noch gezeigt wird.

Vergleicht man die Spektren des DHB, 3-Cl-, 5-Cl- und 3,5-di-Cl-DHB miteinander, siehe Abbildung 31, so fällt auf, daß Chlor in 5-Stellung den kurzwelligen Bereich stark beeinflußt, während Chlor in 3-Stellung den Bereich des $\pi \rightarrow \pi^*$ Überganges modifiziert. Beim 5-Cl-DHB treten die Cotton-Effekte bei gleichen Wellenlängen auf, doch sie haben im Gegensatz zu den der anderen drei Substanzen ein negatives Vorzeichen.

Das Spektrum des 3,5-diCl-DHB scheint aus den additiven Einflüssen der Chlorsubstituenten in 3- und 5-Stellung hervorzugehen. Wie beim 3-Cl-DHB fehlt die Bande bei 255 nm. Auch die Amplituden der Cotton-Effekte scheinen den Mittelwerten der Intensitäten beim 3-Cl- und 5-Cl-DHB zu entsprechen.

Wenn das 3,5-diCl-DHB-Spektrum die additiven Einflüsse der Substituenten in 3- und 5-Stellung widerspiegelt, dann können diese nur elektronischer Natur sein. Die Unterschiede der Spektren der 3- und 5-substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylester können nicht auf der Fixierung verschiedener Konformeren beruhen, da bei Anwesenheit beider Substitutionstypen nur die eine oder die andere Konformation bevorzugt sein sollte.

Die Diskussion der CD-Spektren der 1,2-Diacetoxyderivate der fluorsubstituierten Methylester ist noch schwieriger, da sich mehrere Peaks unter der breiten CD-Bande zwischen 25o - 29o nm zu verbergen scheinen.

Der Vergleich der CD-Spektren zeigt bei allen Substanzen qualitativ die gleichen Cotton-Effekte des $\pi \rightarrow \pi^*$ Überganges des Dienchromophores im Spektralbereich 27o - 29o nm. Dies rechtfertigt die Annahme, daß bei allen Substanzen die gleiche Konformation des Cyclohexadienringes vorliegt.

6.7. Massenspektren der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Zur vergleichenden Diskussion sind die MS-Daten in Tabelle 16a und 16b zusammengestellt.

Markant sind die Isotopenpeak-Paare der Chlor- und Brom-Derivate. Bei den ersteren wird bei Substitution mit einem Chlor die Intensitätsverteilung $M^+/(M^+{+}2)$ = 3/1 und mit zwei Substituenten die Verteilung $M^+/(M^+{+}2)/(M^+{+}4)$ = 9/6/1 gefunden. Die Spektren der Brom-Derivate zeigen das Peak-Paar $M^+/(M^+{+}2)$ mit der Verteilung 1/1.

Die vorliegenden Spektren legen es nahe, daß die Zerfallswege bei den analogen Substanzen gleich sind, da analoge Spaltstücke auftreten. Bei allen Substanzen findet man neben dem Molekülpeak die Fragmentpeaks mit den folgenden Massen: $M^+{-}18$, $M^+{-}49$, $M^+{-}5o$, $M^+{-}59$, $M^+{-}6o$, $M^+{-}77$ und $M^+{-}78$, (vgl. das Spektrum des 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäuremethylesters (BECKMANN, 1976)), sowie Peaks der Zusammensetzung $C_5H_4XOH^+$ und $C_5H_4X^+$, die sehr häufig in Spektren von Aromaten auftreten. Bei den Chlor- und Brom-Derivaten werden noch Fragmente ohne Substituenten gebildet: $M^+{-}X$, $M^+{-}(X{+}18)$, $M^+{-}(X{+}59)$ und $M^+{-}(X{+}6o)$.

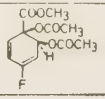
Der Zerfall der 1,2-Diacetoxyderivate der Methylester verläuft nach Abspaltung von 2 x C_2H_2O über analoge Spaltwege wie bei den nicht-derivatisierten Methylestern.

Durch den meta-stabilen Zerfall wurde bisher nur die Zerfallsfolge (1) und (2), siehe Abbildung 12, nachgewiesen. Die Abspaltung von Wasser und Bildung eines phenolischen Aromaten

hat die 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure gemein mit vielen Dihydrodiolen (GIBSON et al., 1968b, 197oa, 197ob, 1973a, 1975; JERINA et al., 1971; YOUNG et al., 1969a, 1969b).

Der Beweis für die in Abbildung 12 dargestellte Zerfallsfolge, die analog zu der des Salicylsäuremethylesters abzulaufen scheint, steht zur Zeit noch aus, wenngleich die passenden Differenzen der Peaks ein Hinweis hierfür sind.

Tab.16a MS-Daten der 1,2-Diacetoxyderivate der Methylester der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

ausgewählte Substitutionsisomere / Bruchstücke		
M^+	254(32)	272(23)
$M-C_2H_2O$	212(7)	23o(1)
$M-2C_2H_2O$	17o(28)	188(21)
$M-(H_2O+2C_2H_2O)$	152(1oo)	17o(1oo)
$M-(H_2O+CH_3O^++2C_2H_2O)$	121(3o)	139(3o)
$M-(H_2O+CH_3OH+2C_2H_2O)$	12o(25)	138(34)
$M-(C_2H_3O_2+2C_2H_2O)$	111(17)	129(8)
$M-(C_2H_4O_2+2C_2H_2O)$	11o(16)	128(26)
$M-(H_2O+C_2H_3O_2+2C_2H_2O)$	93(7)	111(16)
$M-(H_2O+C_2H_4O_2+2C_2H_2O)$	92(3)	11o(3)
C_5H_4XOH	82(5)	1oo(5)
C_5H_4X	65(5)	83(6)

Die Zahlen in Klammern geben die relativen Intensitäten (%) an.

Tab.16b MS-Daten der Methylester der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

ausgewählte Substitutionsisomere / Bruchstücke				
M^+	17o(1oo)	2o6(15) 2o4(44)	25o(3o) 248(3o)	184(63)
$M-H_2O$	152(8)	188(13) 186(37)	232(23) 23o(23)	166(64)
$M-(H_2O+CH_3O^+)$	121(6)	157(7) 155(22)	2o1(5) 199(5)	135(11)
$M-(H_2O+CH_3OH)$	12o(7)	156(34) 154(1oo)	2oo(25) 198(25)	134(44)
$M-C_2H_3O_2$	111(49)	147(16) 145(46)	191(16) 189(16)	125(53)
$M-C_2H_4O_2$	11o(93)	146(24) 144(66)	19o(33) 188(33)	124(55)
$M-(H_2O+C_2H_3O_2)$	93(5o)	129(19) 127(54)	173(9) 171(5)	1o7(1oo)
$M-(H_2O+C_2H_4O_2)$	92(8)	128(22) 126(22)	172(3) 17o(1)	1o6(18)
C_5H_4XOH	82(8o)	118(14) 116(41)	162(2) 16o(2)	96(62)
C_5H_4X	65(37)	1o1(13) 99(41)	145(5) 143(6)	79(34)
M-X		169(2)		
$M-(X+H_2O)$		151(15)	151(25)	
$M-(X+C_2H_3O_2)$		11o(14)	11o(1oo)	
$M-(X+C_2H_4O_2)$		1o9(1o)	1o9(71)	

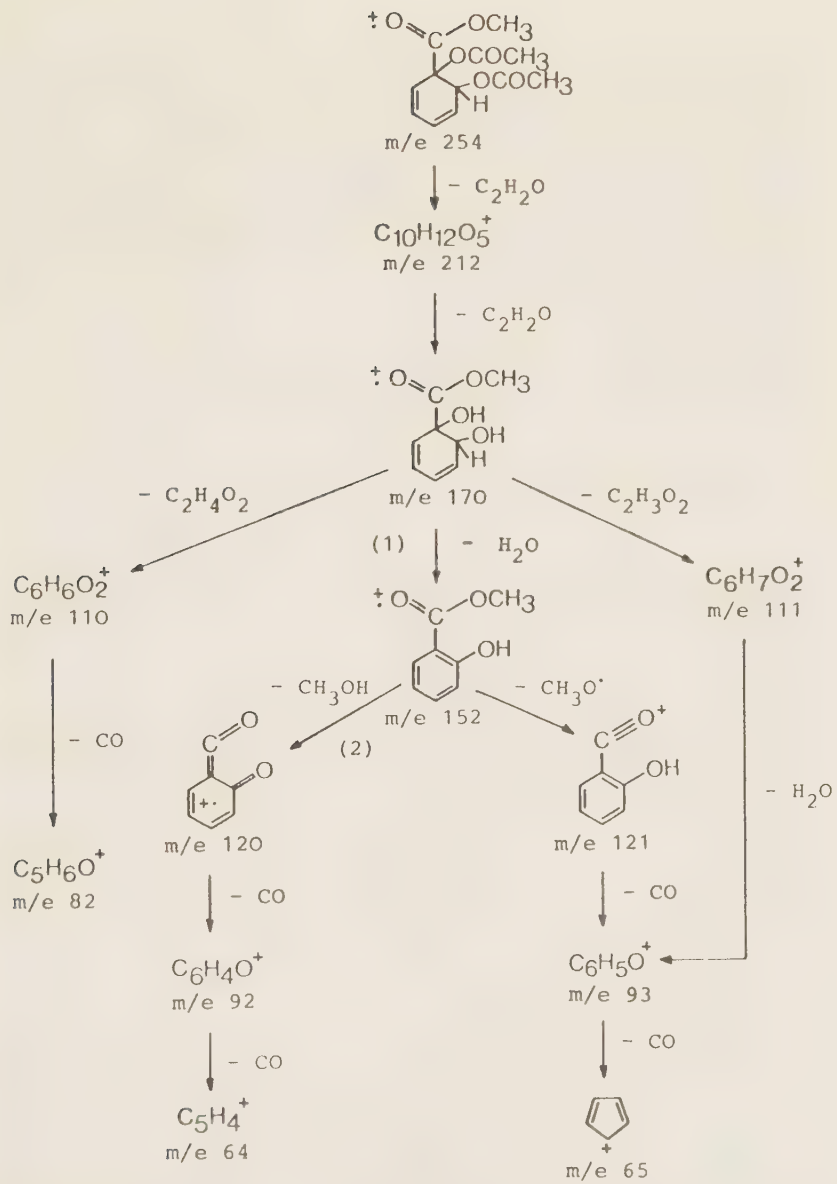


Abb.12 Möglichkeiten der Fragmentierung der derivatisierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure bei der Massenspektroskopie

6.8. Molekülpeaks unter Hochauflösung

Da die Mehrzahl der substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren als Reinsubstanzen nur in sehr kleinen Mengen zur Verfügung standen, wurden anstelle der klassischen Elementaranalyse die Molekülpeaks der Massenspektren unter Hochauflösung ausgewertet. So waren weniger als o,5 mg statt 1o mg erforderlich.

Die gewonnenen Daten sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

Tab.17 Auswertung der Molekülpeaks unter Hochauflösung

Methylester von	Masse (M^+) berechnet	gefunden	Abweichung (ppm)
DHB	17o,o579	17o,o589	+5,9
3-Cl-DHB	2o4,o184	2o4,o187	+1,5
4-Cl-DHB	2o4,o184	2o4,o189	+2,5
5-Cl-DHB	2o4,o184	2o4,o187	+1,5
3,5-diCl-DHB	237,979o	237,9797	+3,o
3-CH_3-DHB	184,o736	184,o738	+1,o
4-CH_3-DHB	184,o736	184,o738	+1,o
5-CH_3-DHB	184,o736	184,o738	+1,o
3-Br-DHB	247,9684	247,9693	+3,6
5-Br-DHB	247,9684	247,9693	+3,6
1,2-Diacetoxyderivat der Methylester von			
DHB	254,o79o	254,o786	-1,6
3-F-DHB	272,o696	272,o7o8	+4,4
4-F-DHB	272,o696	272,o695	-o,4
5-F-DHB	272,o696	272,o695	-o,4
6-F-DHB	272,o696	272,o711	+5,5

6.9. IR-Spektren der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Die wichtigsten Valenzschwingungen der Hydroxyl, der Estercarbonyl und der C=C-Bindung sind in Tabelle 18 aufgeführt. Die für jede Verbindung charakteristischen Banden des "fingerprint"-Bereiches sind aus den Spektren (Abb. 38 - 5o) abzulesen.

Tab.18 Auswertung der IR-Spektren der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

1,2-Diacetoxyderivat des Methylesters	Valenzschwingung (cm^{-1}) >C=O	>C=C<
DHB	1717 (Schulter) 1735 (Schulter) 1745 (s) 1768 (s)	1645 (w)
3-F-DHB	172o (Schulter) 175o (Schulter) 1762 (Schulter) 177o (s)	161o (m) 1696 (m)
4-F-DHB	1718 (Schulter) 1735 (Schulter) 175o (Schulter) 1765 (s)	161o (w) 1679 (m)
5-F-DHB	1718 (Schulter) 1735 (Schulter) 175o (Schulter) 1761 (s)	1614 (w) 1672 (m)
6-F-DHB	1732 (Schulter) 175o (Schulter) 176o (s)	1612 (m) 1683 (m)

Fortsetzung Tab.18

Methylester	Valenzschwingung (cm^{-1}) -O-H	>C=O	>C=C<
DHB	342o (s)	1726 (s) 1746 (s)	
3-Cl-DHB	3355 (s) 3425 (s)	1716 (s)	1577 (m)
4-Cl-DHB	344o (s)	1735 (Schulter) 175o (s)	
5-Cl-DHB	334o (s) 344o (s)	1696 (Schulter) 1718 (s)	163o (m)
3,5-diCl-DHB	335o (s) 3435 (s)	1723 (s)	1586 (m) 163o (m)
3-Br-DHB	338o (s) 3438 (s)	1718 (s)	1574 (m)
5-Br-DHB	334o (s) 344o (s)	1699 (Schulter) 1716 (s)	1622 (m)
3-CH_3-DHB	336o (s) 345o (s)	1718 (s)	159o (w)
4-CH_3-DHB	341o (s)	1735 (Schulter) 1745 (s)	
5-CH_3-DHB	345o (s)	1735 (Schulter) 1747 (s)	

Die Spektren wurden in Nujol gemessen, mit den Ausnahmen 4-Cl-, 4-CH_3- und 5-CH_3-DHB, die als Öle vermessen wurden.

Die Intensitäten der Banden sind wie folgt abgekürzt: (s) stark, (m) mittelstark und (w) wenig intensiv.

6.1o. Zur Stereochemie der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren

Bei Bakterien führen die den Abbau nicht-phenolischer aromatischer Kohlenwasserstoffe einleitenden Oxygenierungen zu cis-Dihydrodiolen (GIBSON, 1971), bei Säugern dagegen zu den trans-Isomeren (DALY et al., 1972; JERINA und DALY, 1974).

Aus der Stereochemie der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren sollten sowohl Rückschlüsse auf den Mechanismus der Benzoat-Dioxygenase als auch den der Folgereaktion, der DHB-Dehydrogenase, möglich sein.

6.1o.1. Bildung des Acetonides der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure

GIBSON et al. (1973b, 1974), JEFFREY et al. (1975) und LABORDE und GIBSON (1975) berichteten von der Verbrückung von cis-Dihydrodiolen mit 2,2-Dimethoxypropan (FIESER und FIESER, 1967) zu sogenannten Acetoniden oder Isopropylidenderivaten. JEFFREY und seine Mitarbeiter wiesen darauf hin, daß sich aus dem trans-Isomeren des 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin kein entsprechend verbrücktes Derivat darstellen ließ. Nach GIBSON (persönliche Mitteilung) scheinen generell nur cis-Cyclohexadien-1,2-diole mit 2,2-Dimethoxypropan Acetonide zu liefern. Die Verbrückung entsprechender trans-Isomere ist bislang nicht gelungen.

Das Isopropylidenderivat des Methylesters des 3-CH_3-DHB [+], das, wie unter METHODEN 16.8. beschrieben, hergestellt wurde, konnte kristallin in hoher Ausbeute dargestellt werden. Es hat die folgenden Eigenschaften:

Schmelzpunkt: 47,5 - 48,5 ^{o}C; λ_{max}^{MeOH} 267 nm (ε 44oo); Masse: 224,1o55 m/e (berechnet 224,1o49).

+ Das 3-CH_3-DHB wurde anstelle des DHB eingesetzt, da vom DHB nicht mehr genüg Substanz zur Verfügung stand.

Das NMR-Spektrum, siehe ANHANG Abb.22, weist gegenüber der Ausgangsverbindung, Abb.2o, nur den erwarteten Unterschied auf. Es fehlen die beiden breiten Signale der Hydroxylprotonen bei 3,oo und 3,65 ppm, dafür treten zwei zusätzliche Singuletts bei 1,35 und 1,42 ppm der Protonen der beiden geminalen Methylgruppen auf. Im IR-Spektrum des Acetonides, Abb.45, fehlen die beiden typischen OH-Valenzschwingungen der Ausgangsverbindung, Abb.43, da beide Alkoholgruppen derivatisiert sind.

6.1o.2. IR-Spektren der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren in verdünnter Lösung in Tetrachlorkohlenstoff

KUHN (1952, 1954, 1958) und COLE et al. (1959) haben gezeigt, daß Wasserstoffbindungsstudien für die Bestimmung der vermutlichen Konfiguration cyclischer 1,2-Diole benutzt werden können. Sie stellten einen Zusammenhang zwischen dem Abstand $\Delta\nu$ der freien und der intramolekular gebundenen OH-Bande bei 3ooo cm^{-1} und dem Abstand der Hydroxylgruppen im Molekül fest. Aus dem $\Delta\nu$ berechneten sie den Winkel, den die beiden Hydroxylgruppen bilden, und leiteten so die Konfiguration ab.

Bei allen gemessenen 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylestern (DHB, 3-Cl-, 5-Cl-, 3-Br-, 5-Br- und 3-CH_3-DHB) wurde die Bande der freien OH-Schwingung bei 358o cm^{-1} gefunden, die der intramolekular gebundenen OH-Gruppe bei 352o cm^{-1}.

DISKUSSION

1. Einflüsse von Substituenten auf die Oxygenierung von Benzoat

" It should be self-evident that mechanisms for enzymic reactions, including those for reactions catalyzed by oxygenases, must obey the laws of chemistry" (HAMILTON, 1974).

Der durch Oxygenasen aktivierte Sauerstoff könnte einen aromatischen Kern grundsätzlich elektrophil, radikalisch oder nucleophil angreifen. Ohne das Vorhandensein stark elektronenabziehender Substituenten ist ein nucleophiler Angriff an einem homoaromatischen Kern unter physiologischen Bedingungen sehr unwahrscheinlich.

Für Dioxygenase-Reaktionen werden sowohl elektrophile Mechanismen mit Singulett-Sauerstoff als Elektrophil als auch radikalische mit Superoxid-Anion als aktivierte Spezies diskutiert.

Die in der vorliegenden Arbeit an der Benzoat-Dioxygenase sowie die von DORN (1976) an der Pyrocatechase gewonnenen Ergebnisse lassen sich, wie im folgenden gezeigt wird, widerspruchsfrei mit einem elektrophilen Oxygenierungsmechanismus auf der Basis der elektrophilen aromatischen Substitution erklären.

Die elektrophile aromatische Substitution wird bei der Anlagerung des Elektrophils E^+ durch die Bildung eines π-Komplexes eingeleitet. Hier ist das Elektrophil noch an kein bestimmtes Kohlenstoffatom des Ringes fixiert.

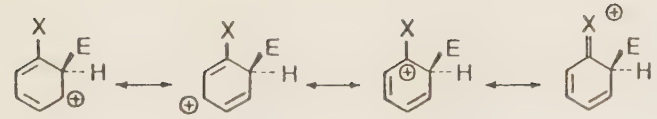
Der π-Komplex lagert sich dann in ein Carboniumion um, indem E^+ mit einem bestimmten Kohlenstoffatom eine σ-Bindung eingeht. Die positive Ladung des sogenannten σ-Komplexes ist dabei über das verbleibende konjugierte System delokalisiert:

Wenn man davon ausgeht, daß die Energie des σ-Komplexes der Aktivierungsenergie des elektrophilen Angriffs entspricht, was in Annäherung zulässig ist, da die Aktivierungsenergie des Übergangszustandes nicht bekannt ist, so wird die Bildung des σ-Komplexes der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt sein.

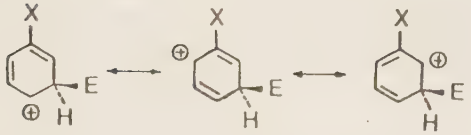
Der σ-Komplex stabilisiert sich dann unter Abspaltung eines Protons und Rückbildung des energetisch günstigen aromatischen Zustandes.

Welche Position ein weiterer Substituent einnimmt, entscheidet sich bei der Bildung des σ-Komplexes, da die Aktivierungsenergien der drei möglichen σ-Komplexe durch einen Erstsubstituenten (X) verschieden beeinflußt werden. Der σ-Komplex ist dabei um so energieärmer, je weitgehender die positive Ladung delokalisiert ist bzw. je mehr sich ein Erstsubstituent zusätzlich an der Delokalisierung beteiligen kann.

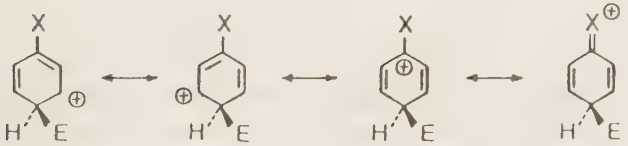
Betrachten wir zuerst Halogen als Erstsubstituent, welches aufgrund der Negativitätsdifferenz zwischen Kohlenstoff und Halogen einen negativen -I-Effekt und wegen der freien Elektronenpaare am Halogen einen positiven mesomeren +M-Effekt ausübt. Solche Substituenten verlangsamen zwar den elektrophilen Angriff am Aromaten, doch können sie aufgrund der Beteiligung ihres freien Elektronenpaares am π-Elektronensystem des aromatischen Kerns die Verlangsamung in bestimmten Positionen am Kern abschwächen. So trägt ein Erstsubstituent mit +M-Effekt in ortho- und para-Position, aber nicht in meta-Position, zusätzlich zur Delokalisierung der positiven Ladung bei, d.h. die Aktivierungsenergien für die Bildung von ortho- und para-Substitutionsprodukten liegen niedriger als für die meta-Produkte. Für das meta-Substitutionsprodukt fehlt die zusätzliche mesomere Grenzstruktur:



ortho



meta

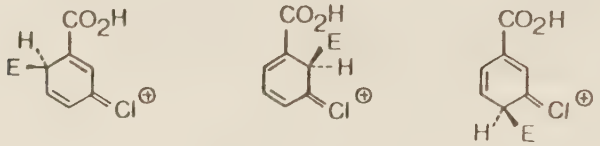


para

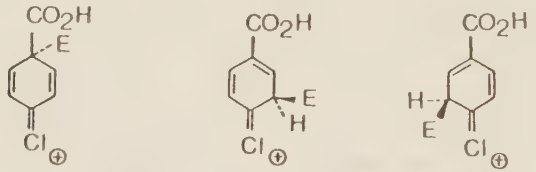
Da bei Halogenen der mesomere Effekt mit Ausnahme von Fluor meist relativ schwach, der induktive dagegen verhältnismäßig stark ist, verlaufen Substitutionen bei Halogenaromaten mit überwiegender o/p-Orientierung langsamer als bei unsubstituierten Aromaten.

Vergleicht man den Angriff der Benzoat-Dioxygenase am 3-Chlorbenzoat (3-Cl-Bzt) mit dem am 4-Chlorbenzoat (4-Cl-Bzt) - die Carboxylgruppe soll hier nicht als Erstsubstituent gelten, da wir Benzoesäure anstelle von Benzol als Grundkörper betrachten - so wird folgender Unterschied deutlich. Beim 3-Cl-Bzt erfahren die σ-Komplexe, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Substitution darstellen, bei Substitutionseintritt in 2-, 4-, oder 6-Stellung die erwähnte zusätzliche Stabilisierung durch Wechselwirkung des π-Elektronensystems des Kerns mit dem freien Elektronenpaar des Chlors, so daß folgen-

de zusätzliche Grenzstrukturen geschrieben werden können:



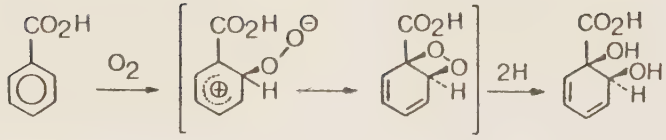
Beim 4-Cl-Bzt sind es die entsprechenden zusätzlichen mesomeren Zustände mit dem eintretenden Zweitsubstituenten (E) an den Kohlenstoffatomen 1, 3 oder 5.



Da 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure als einziges Reaktionsprodukt der Benzoatoxygenierung auftritt, können für die Stabilisierung des σ-Komplexes nur noch Grenzstrukturen diskutiert werden, bei denen das Elektrophil in den Positionen 1, 2 oder 6 angreift.

Vergleicht man die relativen Geschwindigkeiten der Oxygenierung von meta- und para-substituierten Halogenbenzoaten, so wird deutlich, daß die Reaktionen mit meta-substituierten durchweg schneller ablaufen. Dies kann nur so gedeutet werden, daß bei den ersteren ein energieärmerer, d.h. mesomeriereicherer Zwischenzustand durchlaufen wird. Aus dem Vorangegangenen folgt, daß der Sauerstoff primär in o-Stellung zur Carboxylgruppe, d.h. in Position 2 oder 6 angreifen muß.

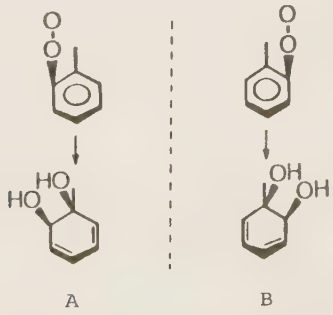
Der Vergleich der relativen Umsatzgeschwindigkeiten der substituierten Benzoate sowie die Tatsache, daß beide Sauerstoffatome des Diendiols aus demselben Sauerstoffmolekül stammen (REINER und HEGEMAN, 1971), stützt den folgenden Mechanismus der Benzoat-Dioxygenase:



In ihrem Gesamtablauf ist die Reaktion nur bis zur Ausbildung des σ-Komplexes mit derjenigen der elektrophilen aromatischen Substitution identisch. Während bei letzterer der Addition unmittelbar die Eliminierung von H^+ unter Rearomatisierung folgt, kann die enzymatische Dioxygenierung unter Epidioxydbildung eher mit einer Additionsreaktion an eine olefinische Doppelbindung verglichen werden.

Die durch das Enzym bewirkte Polarisierung des Sauerstoffmoleküls begünstigt die Ausbildung des Epidioxydes. Die unmittelbar nachgeschaltete Hydrierung der O-O-Bindung, die vermutlich durch das gleiche Enzym katalysiert wird, führt dann zum stabilen Cyclohexadiendiol.

Der Angriff des aktiven Sauerstoffes in Nachbarstellung zur Carboxylgruppe muß stereospezifisch, d.h. z.B. von rechts oben, durch das Enzym festgelegt sein.



Würde der Sauerstoff in beiden chemisch äquivalenten Nachbarstellungen, also in 2- und 6-Stellung, mit gleicher Wahrschein-

lichkeit das Substrat angreifen (Route A und B), so müßte ein optisch inaktives racemisches Gemisch des DHB entstehen.

Entsprechend würden 3- und 5-substituierte DHB als Racemate auftreten, indem das meta-substituierte Benzoat einmal als 3-substituiertes und das andere Mal als 5-substituiertes Benzoat im aktiven Zentrum angeheftet wird.

Tatsächlich entstehen jeweils optisch aktive substituierte 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren, deren CD-Spektren das Vorliegen von Racematen ausschließen.

Der Angriff des Sauerstoffes muß also eindeutig entweder in 2- oder 6-Stellung erfolgen.

Da eine Methylgruppe als Erstsubstituent im Gegensatz zum Chlor einen +I-Effekt ausübt, wird die Reaktivität des aromatischen Kerns mit Elektrophilen erhöht. Noch zusätzlich werden die Übergangszustände in o/p-Position aufgrund des hyperkonjugativen Effektes der Alkylgruppe beim elektrophilen Angriff stabilisiert. Für die meta-Substitution gibt es keine solche zusätzliche Stabilisierung.

Die Aktivierungsenergie für den Umsatz von 4-CH_3-Bzt sollte demnach derjenigen beim Benzoat vergleichbar und im Falle von 3-CH_3-Bzt wegen der zusätzlichen Stabilisierung sogar niedriger sein. Würden also nur die beschriebenen Effekte beim Abbau eine Rolle spielen, so müßten 3- und 4-CH_3-Bzt mindestens so gut, wenn nicht sogar besser als das natürliche Substrat, umgesetzt werden.

Die vorherigen Überlegungen sind jedoch für die Deutung der relativen Umsatzkinetiken nur dann uneingeschränkt anwendbar, wenn die enzymatische Reaktion nicht durch sterische Substituenteneinflüsse gestört wird.

Betrachtet man die relativen Umsatzgeschwindigkeiten der Halogenbenzoate an Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas Stamm B 13, so können die -I-Effekte und die +M-Effekte den deutlich rascheren

Umsatz der 3-Halogenbenzoate gegenüber den 4-substituierten zwanglos erklären. Analysiert man jedoch die Ergebnisse mit den Methylbenzoaten, so zeigt sich, daß für den schlechten Umsatz von 4-substituierten Benzoaten zwar auch die elektronischen Effekte (-I und +M), doch in viel größerem Maße sterische Einflüsse des Substituenten verantwortlich sein müssen. Nur so ist zu erklären, warum 4- gegenüber 3-CH_3-Bzt und erst recht gegenüber dem natürlichen Substrat so langsam umgesetzt wird.

Da Fluor als Substituent nur wenig größer als Wasserstoff ist, sollten die Umsatzgeschwindigkeiten nur sehr wenig von sterischen Faktoren beeinflußt werden. (Für Fluor-substituierte Aromaten ist deshalb generell ein relativ hoher cometabolischer Umsatz zu erwarten.) Bei Pseudomonas Stamm B 13 wird dies auch gefunden. So wird 4-F-Bzt nur um etwa 5o% langsamer als das 3-F-Bzt umgesetzt. Die Umsatzgeschwindigkeiten verhalten sich also wie 1:2 (4-F-Bzt:3-F-Bzt) und nicht wie ungefähr 1:1ooo (4-substituierte : 3-substituierte Bzt) bei Gegenwart der voluminöseren Substituenten Chlor, Brom oder Methyl.

Die Versuche mit Pseudomonas putida (arvilla) mt2 zeigen, daß die durch die Raumerfüllung eines Substituenten hervorgerufene Reaktionsverlangsamung nicht zwangsläufig auftreten muß, wie sie bei Pseudomonas Stamm B 13 und Alcaligenes eutrophus gefunden wurde. Bei Pseudomonas putida (arvilla) mt2 lassen sich die polaren Effekte, besonders der +M-Effekt, ohne Verfälschung durch sterische Faktoren ablesen.

So werden auch hier meta-substituierte Benzoate gegenüber den para-substituierten schneller umgesetzt, was den beschriebenen Mechanismus der Benzoat-Dioxygenase bestätigt. In Übereinstimmung mit der Theorie werden Benzoate mit Elektronendonor-Substituenten schneller als solche mit -I-Effekt metabolisiert.

Aufgrund des sterischen Substituenteneinflusses entstehen aus

meta-substituierten Benzoaten 3- und 5-substituierte 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren in ungleichen Mengen. Die relativen Bildungsgeschwindigkeiten können dabei nur von der Affinität des Enzymes zum Substrat abhängen. Das Enzym kann also zwischen 3- und 5-substituierten Benzoaten als prochirale Formen unterscheiden. Es existieren für beide Formen unterschiedliche Affinitäten, wobei der Enzym-Substrat-Komplex mit 3-substituiertem Benzoat stabiler als mit 5-substituiertem sein muß. So entsteht überwiegend 3-substituiertes Produkt.

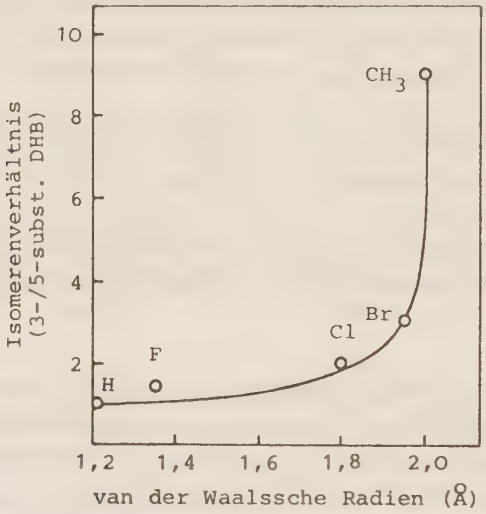


Abb.13 Abhängigkeit des Verhältnisses der aus meta-substituierten Benzoaten gebildeten 3- und 5-substituierten Isomeren von der Größe des Substituenten

Wie die Abbildung 13 zeigt, hängt das Isomerenverhältnis nur von der Größe und nicht der Polarität des Substituenten ab. Je größer der Substituent ist, desto weiter verschiebt sich das Isomerenverhältnis zugunsten des 3-substituierten Isomeren. Da Brombenzoat gegenüber Chlorbenzoat trotz praktisch gleicher Hammett-Konstanten langsamer umgesetzt wird, kann man annehmen,

daß sich der Substituent in 5-Stellung negativ und nicht der in 3-Stellung positiv auf die Anheftung an das Enzym auswirkt.

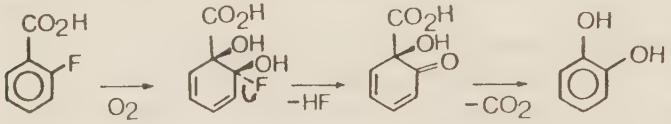
Eine abschließende Diskussion der oben analysierten Ergebnisse kann jedoch erst geführt werden, wenn die Einflüsse der Substituenten auf die Permeation des Benzoates durch die Membran untersucht bzw. die bisher gewonnenen Ergebnisse mit zellfreiem Extrakt überprüft worden sind. So bleibt die Aussagekraft vorerst eingeschränkt, wenngleich wahrscheinlich kein aktiver Transport, sondern erleichterte Diffusion (COOK und FEWSON, 1972) oder Diffusion für Benzoat vorliegt.

Da durch Halogensubstituenten die Lipophilie des Benzoates erhöht wird, was anhand der längeren Retentionszeiten für Halogenbenzoate bei der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie deutlich wird, sollte im Falle von Diffusion der Transport durch die Membran nicht erschwert sein.

Auf eine weitere wichtige Eigenschaft der Benzoat-Dioxygenase machten uns die Arbeiten von GOLDMAN et al. (1967) und MILNE et al. (1968) aufmerksam. Die Autoren isolierten einen Organismus, der auf o-Fluorbenzoat als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann, bei welchem Brenzcatechin als Metabolit nachgewiesen wurde. Sie formulierten einen Mechanismus, der erklärt wie Brenzcatechin unter Freisetzung von Fluorid aus o-Fluorbenzoat nach Oxygenierung entstehen könnte.

Versuche mit der Mutante Pseudomonas Stamm B 13/27 B zeigen eindeutig, daß Fluorid durch die Benzoat-Dioxygenase und nicht durch die DHB-Dehydrogenase, wie es CLARKE et al. (1975) vermuteten, freigesetzt wird. Es wurden 5o% des organisch gebundenen Fluors als Fluorid freigesetzt (SCHREIBER, 1976), was wiederum zeigt, daß das Enzym bei der Bindung von o-Fluorbenzoat im aktiven Zentrum zwei prochirale Formen, das 6-F- und das 2-F-Bzt, erkennt. Beim gebildeten 2-F-DHB stehen dann

Fluor und eine Hydroxylgruppe an einem Kohlenstoffatom, was zur spontanen Eliminierung von Fluorid führen kann.



Wahrscheinlich verlaufen Fluorideliminierung und Decarboxylierung zum Brenzcatechin nicht-enzymatisch. Im vorliegenden Beispiel ist der seltene Fall zu sehen, bei dem ein persistenzverursachender Substituent allein durch die Wirkung einer Oxygenase eliminiert wird. Dies kann bei mangelhaftem Einblick in den tatsächlichen Reaktionsmechanismus hydrolytische anstelle von oxygenolytischer Eliminierung vortäuschen.

2. Einflüsse von Substituenten auf den Umsatz von 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure

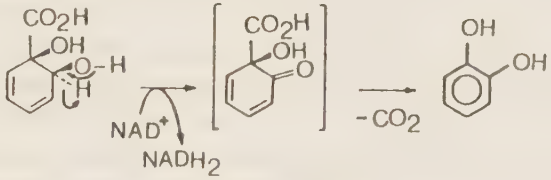
Cis-Dihydrodiole wurden bisher als Intermediärprodukte der bakteriellen Oxidation von Benzol (GIBSON et al., 1968a, 197ob; HÖGN und JAENICKE, 1972), Toluol (GIBSON et al., 197oa; KOBAL et al., 1973; ZIFFER et al., 1973), Äthylbenzol (GIBSON et al., 1973a), Biphenyl (GIBSON et al., 1973b), Benzoesäure (REINER und HEGEMAN, 1971), 5-Amino-4-chlor-2-phenyl-3(2H)-pyridazinon (DE FRENNE et al., 1973) und Naphthalin (JERINA et al., 1971) nachgewiesen.

In nahezu allen Fällen katalysiert eine NAD^+-spezifische Oxidoreduktase die Oxidation der cis-Dihydrodiole zu den entsprechenden Brenzcatechin-Derivaten.

Die Enzyme, die die Oxidation von DHB (REINER, 1972), cis-Benzoldihydrodiol (AXCELL und GEARY, 1973) sowie cis-Naphthalindihydrodiol (PATEL und GIBSON, 1974) durchführen, wurden angereichert und ihre Eigenschaften beschrieben.

Mit den gereinigten DHB-Dehydrogenasen aus Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas Stamm B 13 wurden kinetische Daten mit verschieden substituierten Substrate ermittelt.

REINER (1972) formulierte einen Reaktionsmechanismus, bei dem der Bildung der β-Ketosäure die spontane Decarboxylierung zum Brenzcatechin folgt:



Anhand der relativen, maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten für unterschiedlich substituierte Substrate sollte der geschwindigkeitsbestimmende Schritt erkennbar sein. Es zeigt sich, daß die gewonnenen Ergebnisse keine eindeutige Aussage zulassen, ob die Hydrid-Eliminierung oder die Deprotonierung geschwindigkeitsbestimmend ist.

Elektronenabziehende Substituenten, wie Chlor und Brom, verlangsamen die Reaktion nur schwach, wenn sie in 5-Stellung stehen, während sie in 3-Stellung stärker verlangsamend wirken. Der Unterschied für beide Stellungen ist besonders groß für das Enzym aus Alcaligenes eutrophus.

Diametral dazu verlangsamt ein Methylsubstituent die Reaktion in 5-Stellung stärker als in 3-Stellung. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch einen Fluorsubstituenten nur wenig beeinflußt.

Bei der Anheftung des Substrates an das Enzym sind vermutlich zwei Faktoren von Bedeutung.

Da mit Methylestern keine $NADH_2$-Bildung und auch keine Hemmung festgestellt werden konnte, muß man folgern, daß die Carboxylgruppe für die Anheftung notwendig ist. Gestützt wird diese Vermutung durch den Befund, daß cis-Cyclohexadien-1,2-diol weder Substrat noch Hemmstoff für die DHB-Dehydrogenase ist (REINER, 1972).

Wahrscheinlich besitzt die DHB-Dehydrogenase, ähnlich wie die Naphthalindihydrodiol-Dehydrogenase (JEFFREY et al., 1975), eine Spezifität für ein bestimmtes cis-Isomer. Aus diesem Grund ist möglicherweise die 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure weder Substrat noch Hemmstoff für die DHB-Dehydrogenasen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß der zweite, aromatische Ring als Substituent zu voluminös ist, da bei einem Substituenten in 4-Stellung die Affinität des Enzymes stark vermindert ist. Für die Bindung des Substrates kann jedoch nicht allein die Größe des Substituenten, sondern muß auch dessen Polarität maßgebend sein. So wird 4-F-DHB schlechter als 4-CH_3-DHB an das Enzym gebunden, obwohl das Fluor viel kleiner ist. Fluor verursacht auch in 3- und 5-Stellung verminderte Affinität.

Der Vergleich der Enzyme aus Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas Stamm B 13 zeigt, daß mit der Ausnahme von Fluor für alle Substituenten in 3- oder 5-Stellung das Enzym aus Pseudomonas Stamm B 13 höhere, hingegen bei Substituenten in 4-Stellung geringere Affinität aufweist.

Insgesamt zeigen die Enzyme aus den beiden Organismen bezüglich der Umsatzkinetiken substituierter 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren keine signifikanten Unterschiede.

Gegenüber der Benzoat-Dioxygenase und der Pyrocatechase (s. DORN, 1976) wird die DHB-Dehydrogenase-Reaktion durch Halogensubstituenten nicht kritisch verlangsamt.

3. Stereochemie der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure

Bei Bakterien ist der erste oxidative Schritt im Metabolismus von aromatischen Kohlenwasserstoff die Bildung von cis-Dihydrodiolen (GIBSON, 1971) durch Dioxygenasen, die beide Atome des molekularen Sauerstoffes in das Substrat einbauen (GIBSON et al., 197ob). Im Gegensatz dazu wird der Abbau von aromatischen Verbindungen in Säugern durch Monooxygenasen (mischfunktionellen Oxygenasen) eingeleitet, die das Substrat in ein trans-Dihydrodiol umwandeln, wobei nur ein Atom des Sauerstoffes aus dem molekularen Sauerstoff stammt. Das trans-Isomere entsteht aus dem intermediär gebildeten Arenoxid, das enzymatisch hydratisiert wird (DALY et al., 1972; JERINA und DALY, 1974).

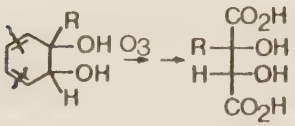
Die Analyse der Stereochemie der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure ist folglich für die obige Generalisierung von Bedeutung.

Die von REINER und HEGEMAN (1971) isolierte Verbindung ist das erste Cyclohexadiendiol, das an einem Hydroxylkohlenstoff anstelle eines Wasserstoffes einen anderen Substituenten hat. Dies erschwert die stereochemische Analyse der Glykolgruppierung, da die bis jetzt angewandten Methoden der Strukturaufklärung versagen müssen.

So entfallen Methoden, die auf dem Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten der cis- und trans-Isomeren beruhen, wie z.B. Glykolspaltung oder Dehydratation, die von JEFFREY und Mitarbeitern (1975) für die Zuordnung der cis- und trans-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthaline genutzt wurden. Folglich sind die Bestimmung der Reaktionsrate mit Perjodat sowie die Farbreaktion mit Natriumacetylosmat, wie sie von REINER und HEGEMAN (1971) durchgeführt wurden, nur von geringer Beweiskraft für das Vorliegen einer cis-Diolgruppierung.

YOUNG und GIBSON (1969) konnten Cyclohexadien-1,2-diole mittels Ozonolyse in Weinsäure überführen und mit Hilfe der Optischen-

Rotationsdispersion einem bestimmten Stereoisomeren zuordnen.

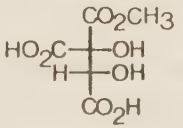


R = H YOUNG und GIBSON (1969)

R = COOH 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure

Da die absolute Konfiguration der Weinsäuren bekannt ist, konnte auch die der Cyclohexadien-1,2-diole angegeben werden.

Diese elegante Methode läßt sich für die Analyse des DHB jedoch nicht anwenden, da das bei der Ozonolyse entstehende Produkt nur noch ein chirales Zentrum hat. Die Decarboxylierung zur Weinsäure müßte unter Konfigurationserhaltung ablaufen, was jedoch nicht garantiert ist. Vom Methylester des DHB ausgehend ließe sich zwar unter Umständen die Ozonolyse zu einem chemisch und sterisch stabilen Produkt leiten,



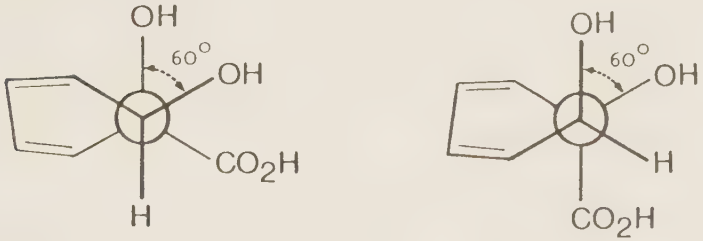
jedoch wäre keine entsprechende, chirale Vergleichssubstanz verfügbar.

Die bewährte Methode zur Unterscheidung zwischen cis- und trans-Diolen mittels NMR-Spektroskopie ist hier ebenfalls nicht anwendbar, da das Proton an dem die Hydroxylgruppe tragenden Kohlenstoffatom durch die Carboxylgruppe ersetzt ist. Beim Vorhandensein beider Wasserstoffe an C_1 und C_2 ließe sich anhand der Kopplungskonstanten der Diederwinkel bestimmen, den die beiden C-H-Bindungen miteinander bilden. Die Konfiguration wäre geklärt (s. JEFFREY et al., 1975).

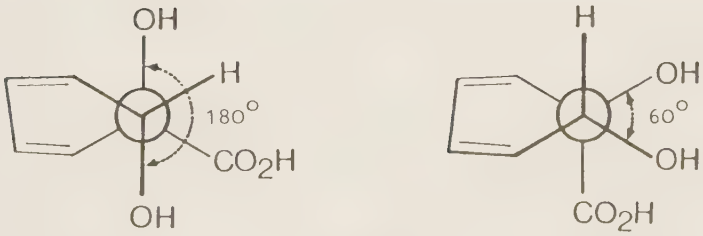
Da diese eleganten Methoden nicht eingesetzt werden konnten, wurde, wie im folgenden gezeigt wird, ein anderer Weg der Konfigurationsbestimmung eingeschlagen.

Von der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure kann es vier Konfigurationsisomeren geben, je ein Enantiomerenpaar des cis- und des trans-Diols. Außerdem kann jedes wegen des nicht-planaren Ringes in zwei konformeren Formen auftreten.

Betrachten wir je ein Enantiomer des cis- und trans-Glykols mit den jeweiligen zwei Konformeren, so wird mit Hilfe der Newman-Projektion (NEWMAN, 1955) der Unterschied zwischen den cis- und trans-1,2-Glykolen des Cyclohexadiens deutlich.



cis



trans

Das Molekül wird bei dieser Projektion längs der C_2-C_1-Bindung betrachtet, so daß die Carboxylgruppe hinten steht. Beim cis-Isomeren stehen in beiden möglichen Konformationen des Ringes jeweils eine Hydroxylgruppe axial und die andere äqutorial. Beim trans-Isomeren stehen beide entweder axial oder äquatorial. Die Newman-Projektion zeigt, daß vom trans-Isomeren ein Konformer vorhanden ist, bei dem, ebenso wie bei den cis-Konformeren, die Hydroxylgruppen einen Winkel von 60° bilden.

Auf einen Unterschied muß jedoch hingewiesen werden:
Während das cis-Isomer beim Übergang der beiden Konformeren ineinander die synperiplanare Anordnung mit einem Winkel von 0° durchläuft, kann das trans-Isomer nur zur antiperiplanaren Anordnung durchklappen, d.h. der Winkel, den die beiden Hydroxylgruppen bilden, wird nie kleiner als 60°. Daraus resultiert, daß ein trans-Cyclohexadien-1,2-diol nicht alle für cis-Isomere typischen Reaktionen durchführen kann.

Schon 1923 beobachtete BÖESEKEN unterschiedliches Verhalten von cis- und trans-Isomeren des Cyclohexan-1,2-diols. So ließ sich das cis-Isomere durch eine Isopropylidengruppe verbrücken, während dies mit dem trans-Isomeren nicht gelang.

Betrachtungen an Dreiding-Stereomodellen bestätigen dieses Ergebnis für Cyclohexadien-1,2-diole, wonach trans-Diole nicht zur Acetonid-Bildung befähigt sein sollten.

GIBSON et al. (1974) vertreten ebenfalls die Ansicht, daß die Reaktion einer Verbindung mit 2,2-Dimethoxypropan zu einem Isopropyliden-Derivat als Beweis für die cis-Konfiguration der Hydroxylgruppen von Cyclohexadien-1,2-diolen angesehen werden kann. So beschreiben JEFFREY et al. (1975) die Derivatisierung von cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin zum Acetonid, während vom trans-Isomeren kein solches Derivat gebildet werden konnte.

Die Derivatisierbarkeit des DHB mit 2,2-Dimethoxypropan zum

Isopropyliden-Derivat macht also die cis-Konfiguration der Diolgruppierung sehr wahrscheinlich.

Ein weiterer Hinweis für diese Konfiguration läßt sich aus den IR-Spektren ablesen.

KUHN (1952, 1954, 1958) und COLE et al. (1959) beobachteten, daß cis-1,2-Glykole in verdünnter Lösung von Tetrachlorkohlenstoff bei etwa 3ooo cm^{-1} zwei Banden zeigten, wobei die mit höherer Schwingungszahl der freien Hydroxylgruppe und die bei niedriger von der intramolekularen, durch Wasserstoffbrücken gebundenen Hydroxylgruppe hervorgerufen wird. Sie stellten einen Zusammenhang zwischen dem Abstand $\Delta\nu$ der OH-Banden und der Länge der Wasserstoffbrückenbindung fest, aus der sich der Abstand der beiden Hydroxylgruppen im Molekül und damit der von diesen gebildete Winkel berechnen ließ. Je größer der Abstand $\Delta\nu$ der OH-Valenzschwingungen, um so kleiner ist der Winkel, den die Hydroxylgruppen miteinander bilden.

Von den cis- und trans-Cyclohexan-1,2-diolen wurden die $\Delta\nu$-Werte von 38 bzw. 32 cm^{-1} gemessen, was den Winkeln $5o^{o}$ bzw. $6o^{o}$ entspricht.

Für die 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure und alle gemessenen substituierten Derivate wurde ein $\Delta\nu$-Wert von 6o cm^{-1} ermittelt. Dieser ist mit dem Abstand $\Delta\nu$ des cis-Cyclopentan-1,2-diols von 61 cm^{-1} vergleichbar (KUHN, 1954), was einem Winkel von o^{o} entspricht. Ein solcher Winkel ist für ein trans-Isomer der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure, wie oben diskutiert, nicht möglich. Nur in einem cis-Isomer können die Hydroxylgruppen die synperiplanare Anordnung einnehmen.

Alle besprochenen Hinweise sowie der Befund, daß beide Sauerstoffatome der Hydroxylgruppen aus dem molekularen Sauerstoff stammen (REINER und HEGEMAN, 1971), sprechen für die cis-Konfiguration der 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure.

4. Möglichkeiten der Verwertung neuer Substrate

Von Pseudomonas-Arten ist bekannt, daß sie viele verschiedene organische Verbindungen verwerten können. Sie besitzen eine große Vielfalt peripherer katabolischer Enzyme, um auch recht ungewöhnliche Substrate in Intermediate für die zentralen metabolischen Wege umzuwandeln und zu verwerten. Die Zahl organischer Verbindungen in der Umwelt ist in den letzten Jahrzehnten durch Produkte der chemischen Industrie stark vermehrt worden, was einen Selektionsdruck für die Evolution von Enzymen zum Abbau von zum Teil "unphysiologischen" Verbindungen erzeugte.

Die Fähigkeit zur Verwertung organischer Verbindungen setzt jedoch eine Vielzahl metabolischer Eigenschaften voraus. So kann eine Verbindung nur dann als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle dienen, wenn sie in die Zelle gelangt. Weiter muß sie Induktor für die Enzyme sein, die sie in passende metabolische Intermediate umwandeln. Die Enzyme müssen die Verbindung und ihre Produkte aber auch mit ausreichend hoher Rate umsetzen. Außerdem darf die Verbindung oder eines der Produkte kein Hemmstoff von essentiellen Zellaktivitäten sein.

Für gewisse synthetische organische Verbindungen, z.B. die halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe, müssen jedoch mehrere der aufgeführten Bedingungen nicht erfüllt sein, was sich anhand der Akkumulation dieser Verbindungen in der Umwelt zu erkennen gibt. Dennoch gibt es Ausnahmen, wo kompliziert gebaute "unphysiologische" Verbindungen, z.B. das Herbizid 2,4-Dichlorphenoxyacetat (EVANS et al., 1971), dem raschen Totalabbau unterliegen und als Kohlenstoff- und Energiequelle verwertet werden.

Der Weg, auf dem sich die Mikroorganismen an neue Substrate adaptieren, soll im folgenden diskutiert werden.

Genetische Änderungen, die erlauben, daß ein Substrat in die Zelle gelangen kann, sollen hier nicht behandelt werden, da bisher

nur sehr wenig über die Art des Transportes von Substraten peripherer Abbauwege bekannt ist. Prinzipiell darf die Barriere der Permeation nicht vernachlässigt werden. Durch die Anwesenheit von Halogensubstituenten wird jedoch die Lipophilie der Substrate erhöht, so daß hier kein Persistenzmoment vermutet werden muß.

Ist das Substrat in die Zelle gelangt, so muß es die Abbauenzyme induzieren können. Der einfachste Mutationsschritt, der zur Nutzung eines neuen Wachstumssubstrates führt, ist der, welcher die konstitutive Bildung der Abbauenzyme bewirkt, solange diese eine gewisse Affinität für die neue Verbindung haben (WOOD, 1966) und sie cometabolisch umsetzen können. Unter natürlichen Standortbedingungen dürften solche Mutanten wegen der unökonomischen Proteinsynthese geringe Bedeutung haben.

Besser ist eine Mutation, die erlaubt, daß das neue Substrat aufgrund der Änderung der Substratspezifität des Repressors die Enzyme induzieren kann, wie es LE BLANC und MORTLOCK (1971) berichteten.

Sind die Aktivitäten der vorhandenen Enzyme für das neue Substrat zu klein, um einen genügend raschen Umsatz zu gewährleisten, so können Änderungen in den Strukturgenen eine höhere Affinität zum neuen Substrat und verbesserte katalytische Qualität bewirken. Mutationen, die höhere Affinität für ein neues Substrat erzeugen, wurden von OLIVER und MORTLOCK (1971), WU et al. (1968) und BETZ et al. (1974) beschrieben. Oft sind hierfür nur wenige Punktmutationen zur Änderung der Substrat-Spezifität notwendig, damit ein Organismus ein neues Wachstumssubstrat verwerten kann (BETZ et al., 1974).

Eine weitere von Mikroorganismen genutzte Möglichkeit zur Erhöhung der Enzymaktivität wurde von RIGBY et al. (1974) berichtet. Die Organismen kompensieren die zu geringe Aktivität für das neue Substrat, indem sie durch Verdopplung der Gene mehr

Enzym produzieren. RIGBY und seine Mitarbeiter weisen darauf hin, daß die Frequenz der Mutationen, welche erhöhte Enzymproduktion bewirken, sehr viel größer ist, als die, welche zu verbesserter Enzymspezifität führen.

Manche Verbindungen können dennoch nicht als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden, da sie zu toxischen Verbindungen wie Fluoracetat oder Fluorsuccinat umgesetzt werden (GOLDMAN, 1969). Die Toleranz gegenüber diesen normalerweise toxischen Verbindungen kann jedoch von Organismen hinzugewonnen werden (GOLDMAN et al., 1967).

Die geringere Aktivität von Pseudomonas Stamm B 13 für den Umsatz des neuen Substrates kann, wie für die Benzoat-Dioxygenase und die DHB-Dehydrogenase beim Wachstum auf 3-Chlorbenzoat gezeigt, ohne Veränderung des Enzymes durch Überproduktion derselben ausgeglichen werden. Ob die erhöhten Enzymsynthesen durch Verdopplung des oder der Strukturgene(s), wie von RIGBY et al. (1974) beschrieben, oder aufgrund größerer Affinität des 3-Chlorbenzoates bzw. 3- und 5-Cl-DHB zum Repressor bewirkt wird, kann zur Zeit nicht beantwortet werden.

Den kritischen Schritt der Ringöffnung der substituierten Brenzcatechine überwindet Pseudomonas Stamm B 13, indem er eine neue zusätzliche Enzymaktivität, die "Chlorpyrocatechase", beim Wachstum auf 3-Chlor- und 3-Brombenzoat sowie 4-Chlorphenol (KNACKMUSS et al., unveröffentlicht) induziert, die für genügend schnellen Umsatz der Halogenbrenzcatechine sorgt (DORN, 1976). Da durch Fluorbenzoate oder ihre Produkte nur die "normale" Pyrocatechase, nicht aber die "Chlorpyrocatechase", induziert wird (SCHREIBER, 1976), kommt es bei Inkubation von Zellen mit 2-Fluor- und 3-Fluorbenzoat zur Anhäufung von toxischen Fluorbrenzcatechinen. Obwohl mit 4-Fluorbenzoat kein Fluorbrenzcatechin angehäuft wird, da dieses von der "normalen" Pyrocatechase schnell genug umgesetzt wird (DORN, 1976), kann der Wildtyp dieses Substrat nur cometabolisieren.

Ein kleiner dem Wasserstoff sterisch ähnlicher Substituent wie

Fluor ist also für einen schnellen cometabolischen Umsatz günstig, wie für die Benzoat-Dioxygenase und die DHB-Dehydrogenase gezeigt. Das Fluorbenzoat ist dann dem Benzoat zu ähnlich, um als Halogenaromat erkannt zu werden, der die essentielle "Chlorpyrocatechase" zu induzieren vermag.

Unter günstigen Bedingungen können genetische Informationen sehr schnell übertragen werden, da, wie kürzlich entdeckt, die Gene einiger catabolischer Enzyme auf Plasmiden liegen (CHAKRABARTY, 1972; DUNN und GUNSALUS, 1973; RHEINWALD et al., 1973; WILLIAMS und MURRAY, 1974).

So könnte der Engpaß für 4-substituierte Benzoate bei Pseudomonas Stamm B 13 durch die Eigenschaft der Benzoat-Dioxygenase aus Pseudomonas putida (arvilla) mt2, die auf einem Plasmid codiert ist (WILLIAMS und MURRAY, 1974), überwunden werden. Damit läge ein potenter Organismus vor, der sämtliche chlor- und bromsubstituierten Benzoate, solange der Substituent nicht in Nachbarschaft zur Carboxylgruppe steht, als Wachstumssubstrat verwerten könnte.

Wenngleich sich prinzipiell eine Vielzahl verschiedener catabolischer Eigenschaften mittels Plasmide in einem Bakterium vereinigen ließen, dürfte die "Synthese" einer "Super-Mikrobe" (Spiegel, 1975), die ungeachtet der enormen Strukturvielfalt der Umweltchemikalien alles abbaut, Utopie bleiben.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei Anzucht von Pseudomonas Stamm B 13 auf 3-Chlorbenzoat wurde gegenüber der auf Benzoat eine um 63% kleinere Zelldichte erreicht. Er wuchs auf Benzoat mit einer Verdopplungszeit von 65 min, auf 3-Chlorbenzoat mit 135 min. Beim Wachstum auf 3-Chlorbenzoat wurden höhere spezifische Aktivitäten der Benzoat-Dioxygenase und der DHB-Dehydrogenase induziert. Das organisch gebundene Chlor wurde zu 1oo% als Chlorid freigesetzt.

2. Es konnte eine DHB-Dehydrogenase negative Mutante, Pseudomonas Stamm B 13/27 B, mit Hilfe von NMG und anschließender Anreicherung mit Penicillin G erhalten werden.

3. Die relativen Geschwindigkeiten der Doppelhydroxylierung substituierter Benzoate konnten durch Messung der Substratabnahme mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie bestimmt werden. Der Substituenteneinfluß wurde an ganzen Zellen von Pseudomonas Stamm B 13 nach Anzucht der Zellen auf Benzoat bzw. 3-Chlorbenzoat sowie an Pseudomonas putida (arvilla) mt2 nach Wachstum auf 3-Methylbenzoat analysiert. Die Umsatzgeschwindigkeit wurde durch Substituenten generell herabgesetzt, durch para-ständige Substituenten stärker als durch meta-ständige. Bei Pseudomonas putida (arvilla) mt2 beruhte dieser Unterschied vorwiegend auf den (+M)-Effekten der Substituenten, während bei Pseudomonas Stamm B 13 sterische Effekte in para-Stellung zusätzlich reaktionsverlangsamend wirksam wurden. Ein Reaktionsmechanismus der Doppelhydroxylierung wurde vorgeschlagen.

4. Die meta-substituierten Benzoate wurden zu jeweils zwei Produkten oxygeniert, die bei der Mutante Pseudomonas Stamm B 13/27 B in die Kulturflüssigkeit ausgeschieden wurden. Das

Isomerenverhältnis der beiden Produkte hing dabei von der Größe, nicht aber der Polarität des Substituenten ab. Je größer der Substituent, desto stärker verschob sich das Verhältnis zugunsten der in 3-Stellung substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure. Die Mutante bildete aus 2-Fluorbenzoat mehrere Produkte, u.a. 6-Fluor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure; gleichzeitig wurde etwa 5o% des gebundenen Fluors als Fluorid eliminiert. Die Doppelhydroxylierung und Fluorideliminierung wurden auf eine einzige Enzymaktivität zurückgeführt.

5. Die DHB-Dehydrogenasen aus Alcaligenes eutrophus und Pseudomonas Stamm B 13 wurden durch DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie und Sephadex G-2oo-Filtration 36 bzw. 2oo-fach angereichert.
   Der Einfluß von Substituenten auf die Bindung und den Umsatz von substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren durch die DHB-Dehydrogenasen wurde analysiert. Es traten im Vergleich zur Benzoatoxygenierung relativ schwache Substituenteneinflüsse auf, so daß keine kritische Verlangsamung dieses katabolischen Schrittes zu beobachten war.

6. Aus substituierten Benzoaten wurden mit der Mutante, Alcaligenes eutrophus B 9, zwölf verschiedenartig substituierte 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren zugänglich. Die Gemische der 3- und 5-Isomeren wurden als Methylester durch Chromatographie getrennt und nach CLAISEN (19o5) in die freien Säuren zurückgespalten.

7. Die substituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylester bzw. deren 1,2-Diacetoxyderivate wurden durch UV-, IR-, NMR- und Massenspektroskopie sowie CD, Schmelzpunkte und Schichtchromatographie charakterisiert.

8. Die cis-Konfiguration der Hydroxylgruppen konnte durch Derivatisierung zum Acetonid sowie die OH-Valenzschwingungen bei verdünnter Lösung in Tetrachlorkohlenstoff bestätigt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

ADELBERG, E.A.
MANDEL, M.
CHEN, G.C.C.
1965 Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidin in Escherichia coli K 12. Biochem. Biophys. Res. Comm. 18, 788-795

AXCELL, B.C.
GEARY, P.J.
1973 The metabolism of benzene by bacteria. Purification and some properties of the enzyme cis-1,2-dihydroxy-cyclohexa-3,5-diene (Nicotinamide adenine dinucleotide) oxidoreductase (cis-benzene glycol dehydrogenase). Biochem. J. 136, 927-934

BECKMANN, W.
1976 Zur biologischen Persistenz von sulfonierten aromatischen Kohlenwasserstoffen: Desulfonierung und Katabolismus der Naphthalin-2-sulfonsäure. Dissertation, Göttingen

BEECHAM, A.F.
MATHIESON, A.McL.
JOHNS, S.R.
LAMBERTON, J.A.
SIOUMIS, A.A.
BATTERHAM, T.J.
YOUNG, I.G.
1971 The influence of allylic oxygen on the CD of skew dienes. Tetrahedron 27, 3725-3738

BEECHAM, A.F.
1971 The influence of allylic oxygen on the $\pi \rightarrow \pi^*$ CD of certain chromophores. Tetrahedron 27, 5207-5216

BEISENHERZ, G.
BOLZE, H.J.
BÜCHER, T.
CZOK, R.
GARBADE, H.K.
MEYER-ARENDT, E.
PFLEIDERER, G.
1953 Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. 8b, 555-577

BERGMANN, J.G.
SANIK, J.,Jr.
1957 Determination of trace amounts of chlorine in naphtha. Anal. Chem. 29, 241-243

BETZ, J.L.
BROWN, P.R.
SMYTH, M.J.
CLARKE, P.H.
1974 Evolution in action. Nature 247, 261-264

BÖESEKEN, J. 1923 Notiz über die Konfiguration der cyclischen 1,2-Diole. Ber. dtsch. chem. Ges. 56, 2409-2411

BOYER, R.F. 1947 A statistical theory of discoloration for halogen containing polymers and copolymers. J. Phys. Chem. 51, 80-106

BURGSTAHLER, A.W. BARKHURST, R.C. 1970 $\pi \rightarrow \pi^*$ region cotton effects of cyclic conjugated dienes and enones. Interpretation in therms of allylic axial chirality contributions. J. Am. Chem. Soc. 92, 7601-7603

CATELANI, D. SORLINI, C. TRECCANI, V. 1971 The metabolism of biphenyl by Pseudomonas putida. Experientia 27, 1173-1174

CATELANI, D. COLOMBI, A. SORLINI, C. TRECCANI, V. 1973 Metabolism of biphenyl. 2-Hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate: The meta-cleavage product from 2,3-dihydroxybiphenyl by Pseudomonas putida. Biochem. J. 134, 1063-1066

CATELANI, D. COLOMBI, A. 1974 Metabolism of biphenyl. Structure and physicochemical properties of 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid, the meta-cleavage product from 2,3-dihydroxybiphenyl by Pseudomonas putida. Biochem. J. 143, 431-434

CHAKRABARTY, A.M. 1972 Genetic basis of the biodegradation of salicylate in Pseudomonas. J. Bacteriol. 112, 815-823

CHAPMAN, P.J. 1975 Bacterial metabolism of 4-chlorobenzoic acid. Abstr. Ann. Meeting ASM 02, S.192

CHARNEY, E. ZIFFER, H. WEISS, U. 1965 Optical activity of non-planar conjugated dienes-II. Transoid dienes. Tetrahedron 21, 3121-3126

CHARNEY, E. 1965 Optical activity of non-planar conjugated dienes-III. HMO calculation of the skew angle dependence. Tetrahedron 21, 3127-3139

CLAISEN, L. 19o5 1o8. Über einige Synthesen unter Anwendung von Natriumamid. III. Einwirkung von Monochloressigester auf Ketone bei Gegenwart von Natriumamid. Ber. dtsch. chem. Ges. 38, 699-7o9

CLARKE, K.F. 1975 Metabolism of monofluorobenzoates by
CALLELY, A.G. Acinetobacter calcoaceticus N.C.I.B.
LIVINGSTONE, A. 825o. Formation of monofluorocatechols.
FEWSON, C.A. Biochim. Biophys. Acta 4o4, 169-179

COLE, A.R.H. 1959 Infrared spectra of natural produts.
MÜLLER, G.T.A. Part IX. Frequencies and intensities
THORNTON, D.W. of hydroxyl absorption bands in tri-
WILLIX, R.L.S. terpenoids and similar compounds. J. Chem. Soc. (London) 1218-1222

COOK, A.M. 1972 Evidence for specific transport
FEWSON, C.A. mechanisms for aromatic compounds in Bacterium N.C.I.B. 825o. Biochim. Biophys. Acta 29o, 384-388

DALY, J.W. 1972 Arene oxides and the NIH shift:
JERINA, D.M. The metabolism, toxicity and carcino-
WITKOP, B. genicity of aromatic compounds. Experimentia 28, 1129-1149

DAVIS, B.D. 1948 Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. J. Am. Chem. Soc. 7o, 4267

DE BOER, T.J. 1954 A new method for the preparation of
BACKER, H.J. diazomethane. Rec. Trav. Chim. 73, 229-234

DE FRENNE, E. 1973 The bacterial degradation of 5-amino-
EBERSPÄCHER, J. 4-chloro-2-phenyl-3(2H)-pyridazinone.
LINGENS, F. Eur. J. Biochem. 33, 357-363

DOONAN, S. 1973 The biochemistry of carbon-halogen compounds. in: The chemistry of the carbon-halogen bond. Edt. S.Patai, J. Wiley & Sons, London, Part 2, 865-915

DORN, E. 1974 Isolation and characterization of a
HELLWIG, M. 3-chlorobenzoate degrading Pseudo-
REINEKE, W. monad.
KNACKMUSS, H.-J. Arch. Microbiol. 99, 61-7o

DORN, E. 1976 Ursachen der biologischen Persistenz halogenierter aromatischer Kohlenwasserstoffe: Der Einfluß von Halogensubstituenten auf die Intradiol-Spaltung von Brenzcatechin. Dissertation, Göttingen

DUNN, N.W.
GUNSALUS, I.C. 1973 Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in Pseudomonas putida. J. Bacteriol. 114, 974-979

EVANS, W.C.
SMITH, B.S.W.
FERNLEY, H.N.
DAVIES, J.I. 1971 Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetate. Biochem. J. 122, 543-551

FEWSON, C.A.
LIVINGSTONE, A.
ROACH, P.J. 197o Benzoate oxidation by Bacterium N.C.I.B. 825o. Biochem. J. 118, 53p

FIESER, L.F.
FIESER, M. 1959 Steroids. Reinhold Publishing Corp., New York

FIESER, L.F.
FIESER, M. 1967 Reagents for organic sythesis. Wiley, New York, S.268

FOCHT, D.D.
ALEXANDER, M. 197o Bacterial degradation of diphenylmethane, a DDT model substrate. Appl. Microbiol. 2o, 6o8-611

GIBSON, D.T.
KOCH, J.R.
KALLIO, R.E. 1968a Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. Biochemistry 7, 2653-2662

GIBSON, D.T.
KOCH, J.R.
KALLIO, R.E. 1968b Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. II. Metabolism of halogenated aromatic hydrocarbons. Biochemistry 7, 3795-38o2

GIBSON, D.T.
HENSLEY, M.
YOSHIOKA, H.
MABRY, T.J. 197oa Formation of (+)-cis-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by Pseudomonas putida. Biochemistry 9, 1626-163o

GIBSON, D.T.
CARDINI, G.E.
MASELES, F.C.
KALLIO, R.E. 197ob Incorporation of oxygen-18 into benzene by Pseudomonas putida. Biochemistry 9, 1631-1635

GIBSON, D.T. 1971 The microbial oxidation of aromatic hydrocarbons. Crit. Rev. Microbiol. 1, 199-223

GIBSON, D.T.
GSCHWENDT, B.
YEH, W.K.
KOBAL, V.M. 1973a Initial reactions in the oxidation of ethylbenzene by Pseudomonas putida. Biochemistry 12, 152o-1528

GIBSON, D.T.
ROBERTS, R.L.
WELLS, M.C.
KOBAL, V.M. 1973b Oxidation of biphenyl by a Beijerinckia species. Biochem. Biophys. Res. Comm. 5o, 211-219

GIBSON, D.T.
MAHADEVAN, V.
DAVEY, J.F. 1974 Bacterial metabolism of para- and meta-xylene: Oxidation of the aromatic ring. J. Bacteriol. 119, 93o-936

GIBSON, D.T.
MAHADEVAN, V.
JERINA, D.M.
YAGI, H.
YEH, H.J.C. 1975 Oxidation of the carcinogens benzo-(a)pyrene and benzo(a)anthracene to dihydrodiols by a bacterium. Science 189, 295-297

GOLDMAN, P.
MILNE, G.W.A.
PIGNATARO, M.T. 1967 Fluorine containing metabolites from 2-fluorobenzoic acid by Pseudomonas species. Arch. Biochem. Biophys. 118, 178-184

GOLDMAN, P. 1969 The carbon-fluorine bond in compounds of biological interest. Science 164, 1123-113o

HAMILTON, G.A. 1974 Chemical models and mechanisms for oxygenases. in: Molecular mechanisms of oxygen activation. Edt. O.Hayaishi. Academic Press, New York, 4o5-451

HARPER, D.B.
BLAKLEY, E.R. 1971 The metabolism of p-fluorobenzoic acid by Pseudomonas sp.. Can. J. Microbiol. 17, 1o15-1o23

HEGEMAN, G.D. 1966 Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by Pseudomonas putida. II. Isolation and properties of blocked mutants. J. Bacteriol. 91, 1155-116o

HÖGN, T.
JAENICKE, L. 1972 Benzene metabolism of Moraxella species. Eur. J. Biochem. 3o, 369-375

ICHIHARA, A.
ADACHI, K.
HOSOKAWA, K.
TAKEDA, Y.
1962 The enzymatic hydroxylation of aromatic carboxylic acids; substrate specifities of anthranilate and benzoate oxidase.
J. Biol. Chem. 237, 2296-2302

JEFFREY, A.M.
YEH, H.J.C.
JERINA, D.M.
PATEL, T.R.
DAVEY, J.F.
GIBSON, D.T.
1975 Initial reactions in the oxidation of naphthalene by Pseudomonas putida.
Biochemistry 14, 575-584

JERINA, D.M.
DALY, J.W.
JEFFREY, A.M.
GIBSON, D.T.
1971 Cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene: A bacterial metabolite from naphthalene.
Arch. Biochem. Biophys. 142, 394-396

JERINA, D.M.
DALY, J.W.
1974 Arene oxides: A new aspect of drug metabolism.
Science 185, 573-582

JOHNSON, B.F.
STANIER, R.Y.
1971 Regulation of the β-ketoadipate pathway in Alcaligenes eutrophus.
J. Bacteriol. 107, 476-485

JOHNSTON, H.W.
BRIGGS, G.G.
ALEXANDER, M.
1972 Metabolism of 3-chlorobenzoic acid by a Pseudomonad.
Soil Biol. Biochem. 4, 187-190

KAUDEWITZ, F.
1959 Inaktivierende und mutagene Wirkung salpetriger Säure auf Zellen von Escherichia coli.
Z. Naturforsch. 14b, 528-537

KEMP, M.B.
HEGEMAN, G.D.
1968 Genetic control of the β-ketoadipate pathway in Pseudomonas aeruginosa.
J. Bacteriol. 96, 1488-1499

KENNEDY, S.J.T.
FEWSON, C.A.
1968 Enzymes of the mandelate pathway in Bacterium N.C.I.B. 8250.
Biochem. J. 107, 497-506

KNACKMUSS, H.-J.
REINEKE, W.
1973 Der Einfluß von Chlorsubstituenten auf die Oxygenierung von Benzoat durch Alcaligenes eutrophus B 9.
Chemosphere 2, 225-230

KNACKMUSS, H.-J.
HELLWIG, M.
LACKNER, H.
OTTING, W.
1976 Cometabolism of 3-methylbenzoate and methylcatechols by a 3-chlorobenzoate utilizing Pseudomonad: Accumulation of (+)-2,5-dihydro-4-methyl- and (+)-2,5-dihydro-2-methyl-5-oxo-furan-2-acetic acid.
Eur. J. Appl. Microbiol. i. Vorb.

KOBAL, V.M.
GIBSON, D.T.
DAVIS, R.E.
GARZA, A.
1973 X-ray determination of the absolute stereochemistry of the initial oxidation product formed from toluene by Pseudomonas putida 39/D.
J. Am. Chem. Soc. 95, 442o-4421

KORTE, F.
KLEIN, W.
1971 Aktuelle Probleme der Umweltchemie (1).
Sonderdruck, PHARMA INTERNATIONAL, Verlag G. Braun, Karlsruhe

KUHN, L.P.
1952 The hydrogen bond.
I. Intra- and intermolecular hydrogen bond in alcohols.
J. Am. Chem. Soc. 74, 2492-2499

KUHN, L.P.
1954 The hydrogen bond.
II. The intramolecular bond in cyclic 1,2-diols.
J. Am. Chem. Soc. 76, 4323-4326

KUHN, L.P.
1958 The hydrogen bond.
III. The effect of the size of substituents upon the length of hydrogen bond in various substituted 1,2-diols.
J. Am. Chem. Soc. 8o, 595o-5954

LABORDE, A.L.
GIBSON, D.T.
1975 Bacterial oxidation of dibenzothiophene.
Abstr. Ann. Meeting ASM Q45, S. 212

LACHER, J.R.
HUMMEL, L.E.
BOHMFALK, E.F.
PARK, J.D.
195o The near ultraviolet absorption spectra of some fluorinated derivatives of methane and ethylene.
J. Am. Chem. Soc. 72, 5486-5489

LA RIVIERE, J.W.M.
1958 On the microbial metabolism of tartaric isomers.
Thesis, Delft

LE BLANC, D.J.
MORTLOCK, R.P.
1971 Metabolism of D-arabinose:
A new pathway in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 1o6, 9o-96

LEDERBERG, J.
ZINDER, N.
1948 Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin.
J. Am. Chem. Soc. 7o, 4267-4268

LEDERBERG, J.
195o Isolation and characterisation of biochemical mutants of bacteria.
Methods in medical Res. 3, 5-22

LEDERBERG, J.
LEDERBERG, E.M. 1952 Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol. 63, 399-4o6

LINGENS, F. 1975 Umweltchemikalien und ihr mikrobieller Abbau. Vortrag, 35. Tagung dtsch. Ges. f. Hyg. Mikrobiol., Mannheim

LIU, Y.-T.
TAKAHASHI, H.
MARUO, B. 1967 Synergistic killing effect of glycine and penicillin, and rapid methods for mutant isolation in Pseudomonas. J. Gen. Appl. Microbiol. 13, 2o5-215

LUNT, D.
EVANS, W.C. 197o The microbial metabolism of biphenyl. Biochem. J. 118, 54p-55p

MANDELSTAM, J.
JACOBY, G.A. 1965 Induction and multi-sensitive end-product repression in the enzymic pathway degrading mandelate in Pseudomonas fluorescens. Biochem. J. 94, 569-577

MATSEN, F.A. 195o Molecular orbital theory and spectra of monosubstituted benzenes. I. Resonance effect. J. Am. Chem. Soc. 72, 5243-5248

MILNE, G.W.A.
GOLDMAN, P.
HOLTZMAN, J.L. 1968 The metabolism of 2-fluorobenzoic acid. II. Studies with $^{18}O_2$. J. Biol. Chem. 243, 5374-5376

MOSCOWITZ, A.
CHARNEY, E.
WEISS, U.
ZIFFER, H. 1961 Optical activity in skewed dienes. J. Am. Chem. Soc. 83, 4661-4663

NEWMAN, M.S. 1955 A notation for the study of certain stereochemical problems. J. Chem. Educ. 32, 344-347

OHMORI, T.
IKAI, T.
MINODA, Y.
YAMADA, K. 1973 Utilization of polyphenyl and polyphenyl-related compounds by microorganisms. Part I. Agr. Biol. Chem. 37, 1599-16o5

OLIVER, E.J.
MORTLOCK, R.P. 1971 Metabolism of D-arabinose by Aerobacter aerogenes: Purification of the isomerase. J. Bacteriol. 1o8, 293-299

ORNSTON, L.N. 1966 The conversion of catechol and protocatechuate to β-ketoadipate by Pseudomonas putida. IV. Regulation. J. Biol. Chem. 241, 3800-3810

PATEL, T.R. GIBSON, D.T. 1974 Purification and properties of (+)-cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase of Pseudomonas putida. J. Bacteriol. 119, 879-888

PFENNIG, N. LIPPERT, K.D. 1966 Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch. Mikrobiol. 55, 245-256

REH, M. 1967 Regulation der Synthese von Isoleucin und Valin durch Hydrogenomonas H 16. Dissertation, Göttingen

REINEKE, W. 1973 Der Einfluß von Chlorsubstitution auf die Oxigenierung von Benzoat durch Bakterien. Diplomarbeit, Göttingen

REINER, A.M. HEGEMAN, G.D. 1971 Metabolism of benzoic acid by bacteria. Accumulation of (-)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid by a mutant strain of Alcaligenes eutrophus. Biochemistry 10, 2530-2536

REINER, A.M. 1971 Metabolism of benzoic acid by bacteria: 3,5-Cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid is an intermediate in the formation of catechol. J. Bacteriol. 108, 89-94

REINER, A.M. 1972 Metabolism of aromatic compounds in bacteria: Purification and properties of the catechol-forming enzyme, 3,5-cylohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid (NAD^+) oxidoreductase (decarboxylating). J. Biol. Chem. 247, 4960-4965

RHEINWALD, J.G. CHAKRABARTY, A.M. GUNSALUS, I.C. 1973 A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in Pseudomonas putida. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 885-889

RIGBY, P.W.J. BURLEIGH, Jr., B.D. HARTLEY, B.S. 1974 Gene duplication in experimental enzyme evolution. Nature 251, 200-204

RUTNER, E.
BAUER, S.H.
1964 A free electron study of substituted 1,3-butadienes.
J. Phys. Chem. 68, 1768-1775

SCHLEGEL, H.G.
JANNASCH, H.W.
1967 Enrichment cultures.
Ann. Rev. Microbiol. 21, 49-7o

SCHLEGEL, H.G.
1965 Methoden der Anreicherung und Isolierung von Mutanten.
in: Anreicherungskultur und Mutantenauslese
Zbl. Bakt. I., Supplementheft 1, 2o4-222

SCHMIDT, K.
LIAAEN JENSEN, S.
SCHLEGEL, H.G.
1963 Die Carotinoide der Thiorhodaceae.
I. Okenon als Hauptcarotinoid von Chromatium okenii Perty.
Arch. Mikrobiol. 46, 117-126

SCHREIBER, A.
1976 Cometabolismus von Fluorbenzoaten: Physiologie des mikrobiellen Umsatzes und Isolierung von Metaboliten.
Diplomarbeit, Göttingen

SCOTT, A.I.
1964 Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products.
Pergamon Press, Oxford

STAAB, H.A.
196o Einführung in die theoretische organische Chemie.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
2. Aufl., S. 318

SISTRON, W.R.
STANIER, R.Y.
1954 The mechanism of formation of β-ketoadipic acid by bacteria.
J. Biol. Chem. 21o, 821-836

WEISS, U.
ZIFFER, H.
CHARNEY, E.
1965 Optical activity of non-planar conjugated dienes-I. Homoannular cisoid dienes.
Tetrahedron 21, 31o5-312o

WILLIAMS, D.H.
FLEMING, I.
1975 Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung.
G. Thieme Verlag, Stuttgart
3. dtsch. Aufl.

WILLIAMS, P.A.
MURRAY, K. 1974 Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by Pseudomonas putida (arvilla) mt2: Evidence for the existence of a TOL plasmid.
J. Bacteriol. 12o, 416-423

WODZINSKI, R.S.
JOHNSON, M.J. 1968 Yields of bacteria cells from hydrocarbons.
Appl. Microbiol. 16, 1886-1891

WODZINSKI, R.S.
COYLE, J.E. 1974 Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria.
Appl. Microbiol. 27, 1o81-1o84

WOOD, W.A. 1966 Carbohydrate metabolism.
Ann. Rev. Biochem. 35, 521-558

WOODWARD, R.B. 1942 Structure and absorption spectra. III. Normal conjugated dienes.
J. Am. Chem. Soc. 64, 72-75

WU, T.T.
LIN, E.C.C.
TANAKA, S. 1968 Mutants of Aerobacter aerogenes capable of utilizing xylitol as a novel carbon.
J. Bacteriol. 96, 447-456

YOUNG, I.G.
GIBSON, F. 1969 The stereochemistry of intermediates involved in the biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid.
Biochim. Biophys. Acta 177, 348-35o

YOUNG, I.G.
JACKMAN, L.M.
GIBSON, F. 1969a The isolation, identification and properties of 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoic acid. An intermediate in the biosythesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid.
Biochim. Biophys. Acta 177, 381-388

YOUNG, I.G.
GIBSON, F.
MAC DONALD, C.G. 1969b Enzymic and nonenzymic transformations of chorismic acid and related cyclohexadienes.
Biochim. Biophys. Acta 192, 62-72

ZIFFER, H.
JERINA, D.M.
GIBSON, D.T.
KOBAL, V.M. 1973 Absolute stereochemistry of the (+)-cis-1,2-dihydroxy-3-methylcyclohexa-3,5-diene produced from toluene by Pseudomonas putida.
J. Am. Chem. Soc. 95, 4o48-4o49

1975 "Super-Mikroben" gegen Ölpest.
Der Spiegel, 29. Jg., Nr. 4o, S. 224

ANHANG

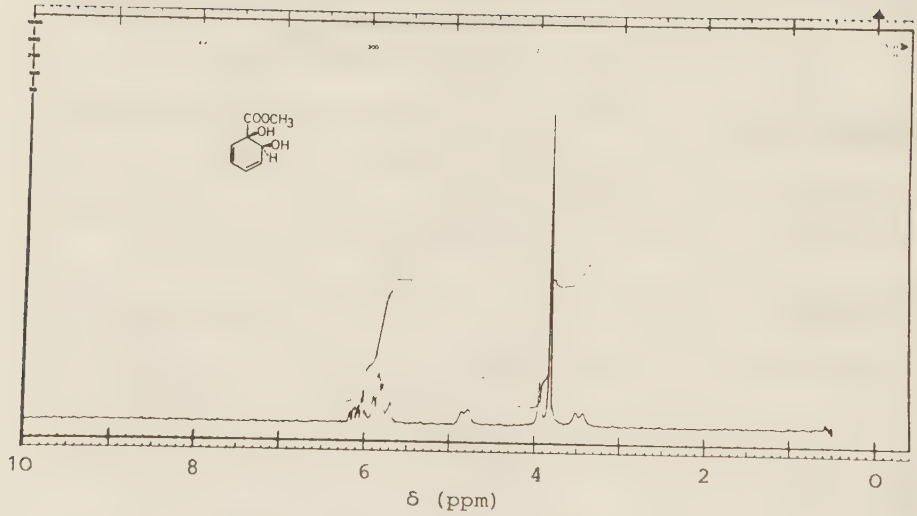


Abb.14 NMR-Spektrum des 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$

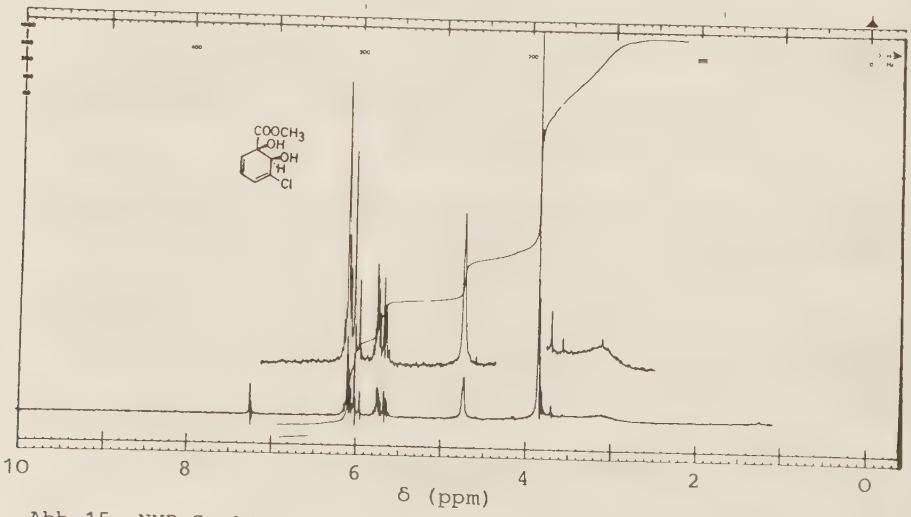


Abb.15 NMR-Spektrum des 3-Chlor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$

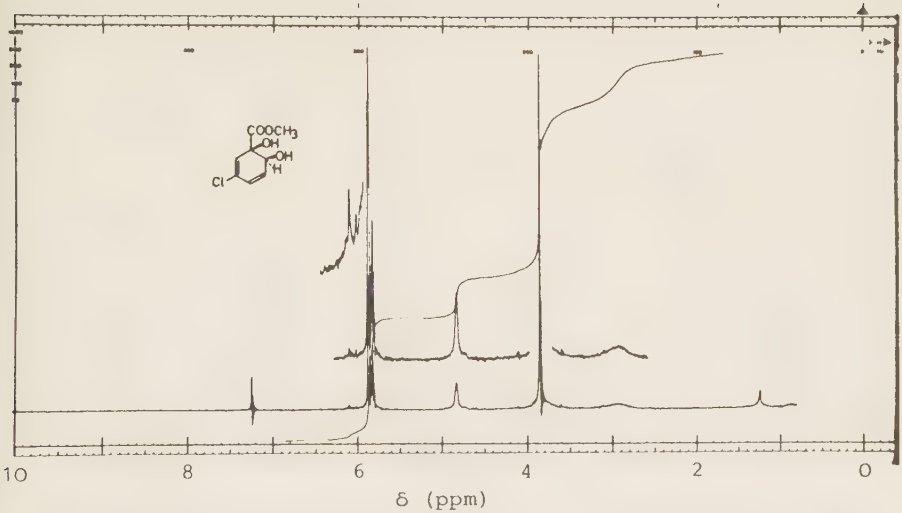


Abb.16 NMR-Spektrum des 5-Chlor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$

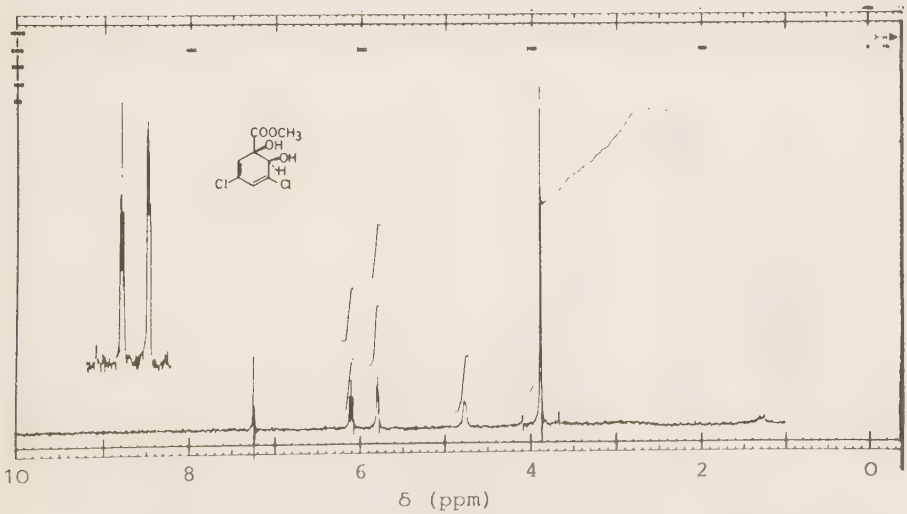


Abb.17 NMR-Spektrum des 3,5-Dichlor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$

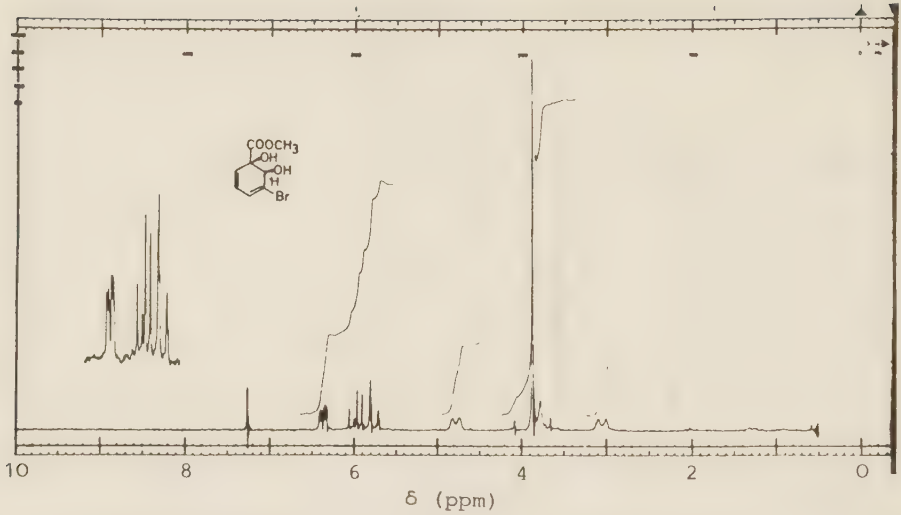


Abb.18 NMR-Spektrum des 3-Brom-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$

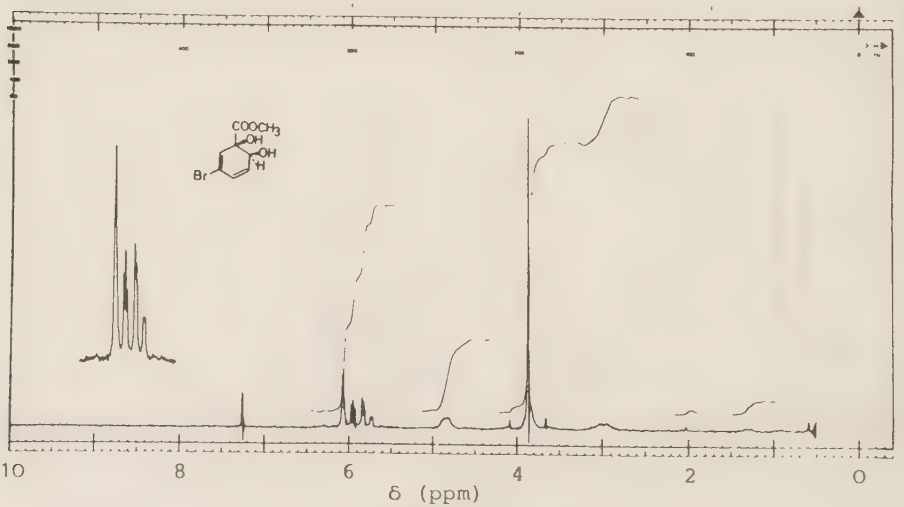


Abb.19 NMR-Spektrum des 5-Brom-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$

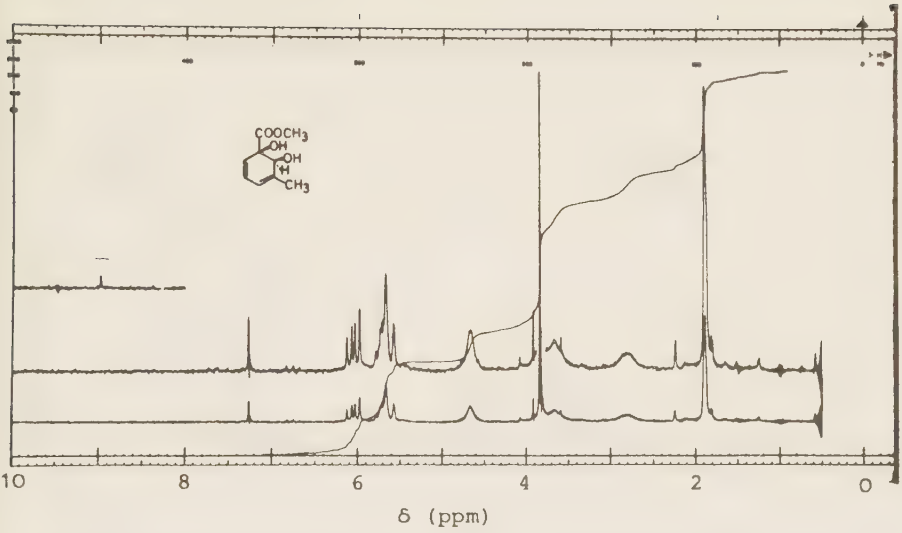


Abb.2o NMR-Spektrum des 3-Methyl-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$

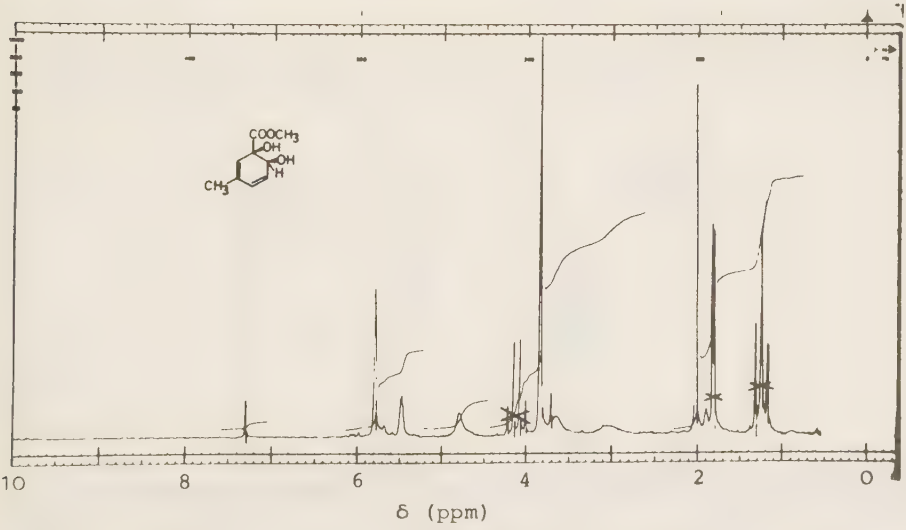


Abb.21 NMR-Spektrum des 5-Methyl-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$, die durch Kreuze gekennzeichneten Signale stammen von Lösungsmittelresten (Äthylacetat)

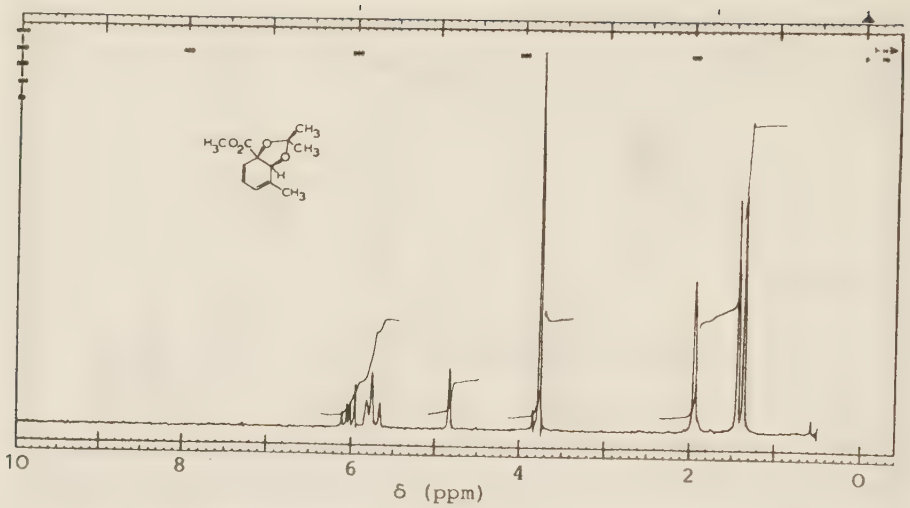


Abb.22 NMR-Spektrum des Isopropylidenderivates des 3-Methyl-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$

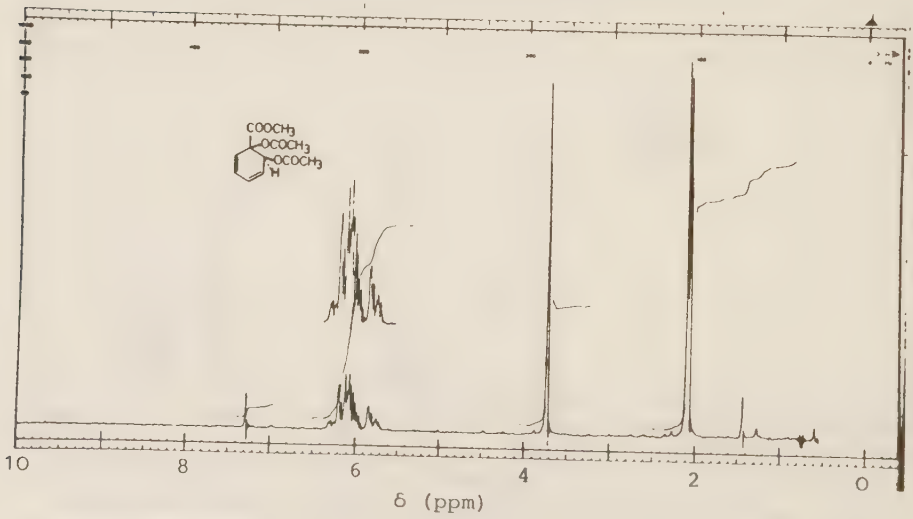


Abb.23 NMR-Spektrum des 1,2-Diacetoxyderivates des 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$

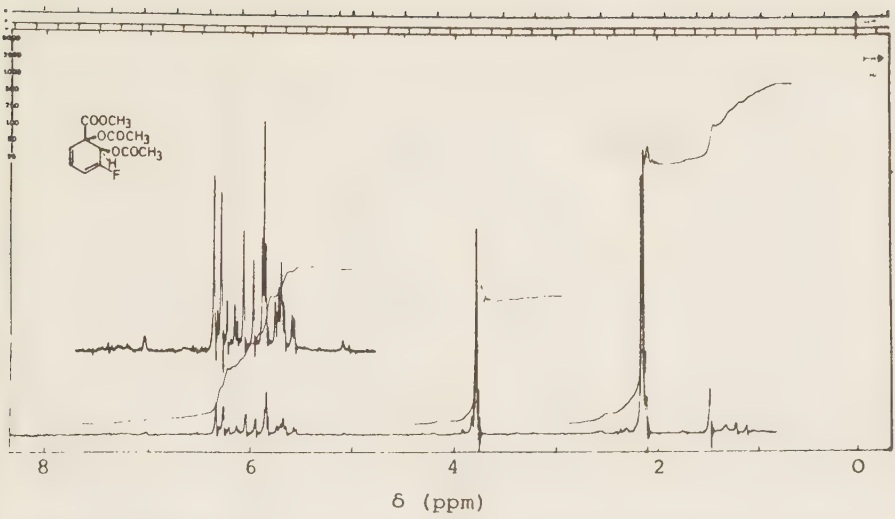


Abb.24 NMR-Spektrum des 1,2-Diacetoxyderivates des 3-Fluor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$

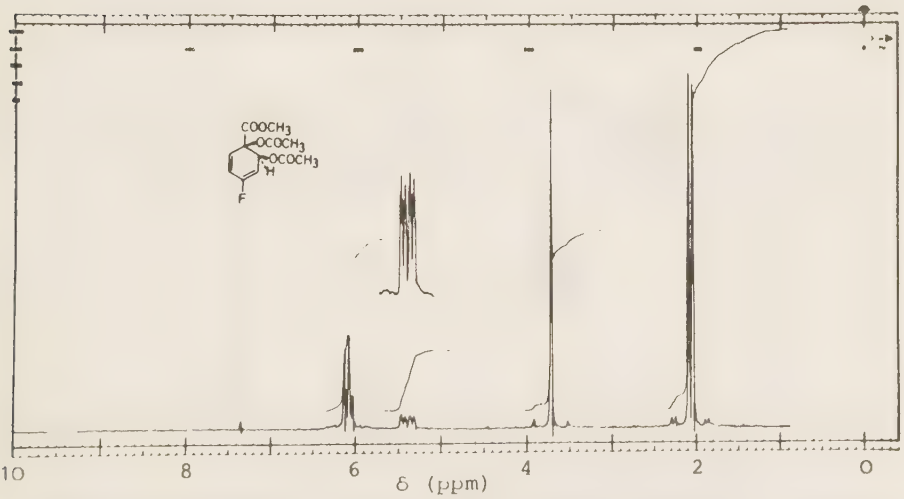


Abb.25 NMR-Spektrum des 1,2-Diacetoxyderivates des 4-Fluor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$

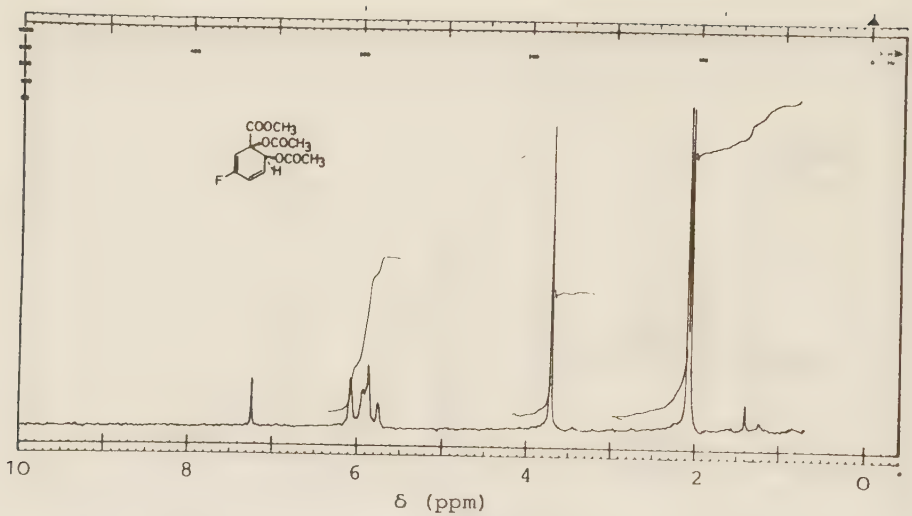


Abb.26 NMR-Spektrum des 1,2-Diacetoxyderivates des 5-Fluor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$

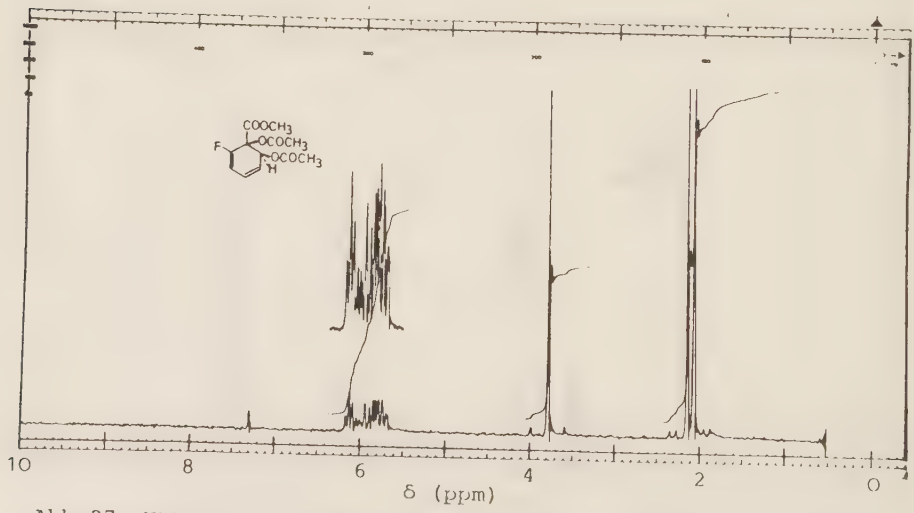


Abb.27 NMR-Spektrum des 1,2-Diacetoxyderivates des 6-Fluor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in $CDCl_3$

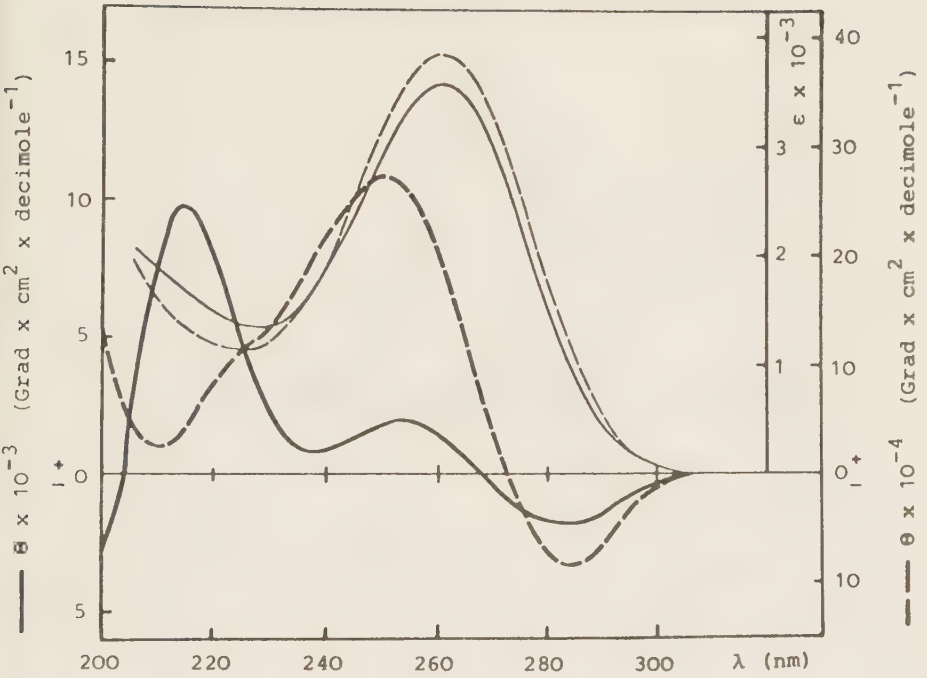


Abb.28 Elektronenspektren von 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylester (UV ——, CD ——) und seines 1,2-Diacetoxyderivates (UV — —, CD — —) in Methanol

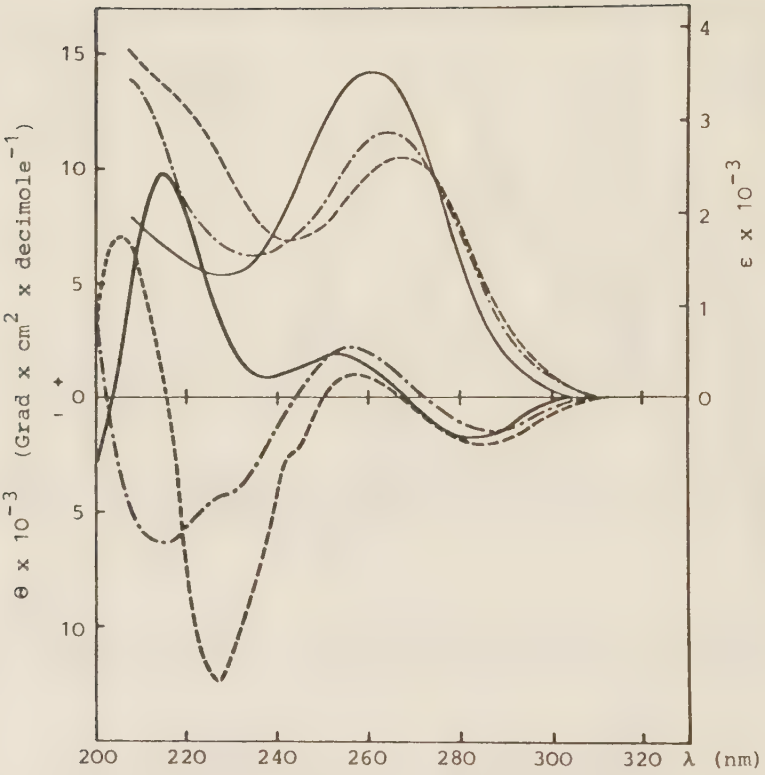


Abb.29 Elektronenspektren von 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylester (UV——, CD ——), 5-Chlor-(UV—·—, CD —·—), 5-Brom-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylester (UV– – –, CD – – – –) in Methanol

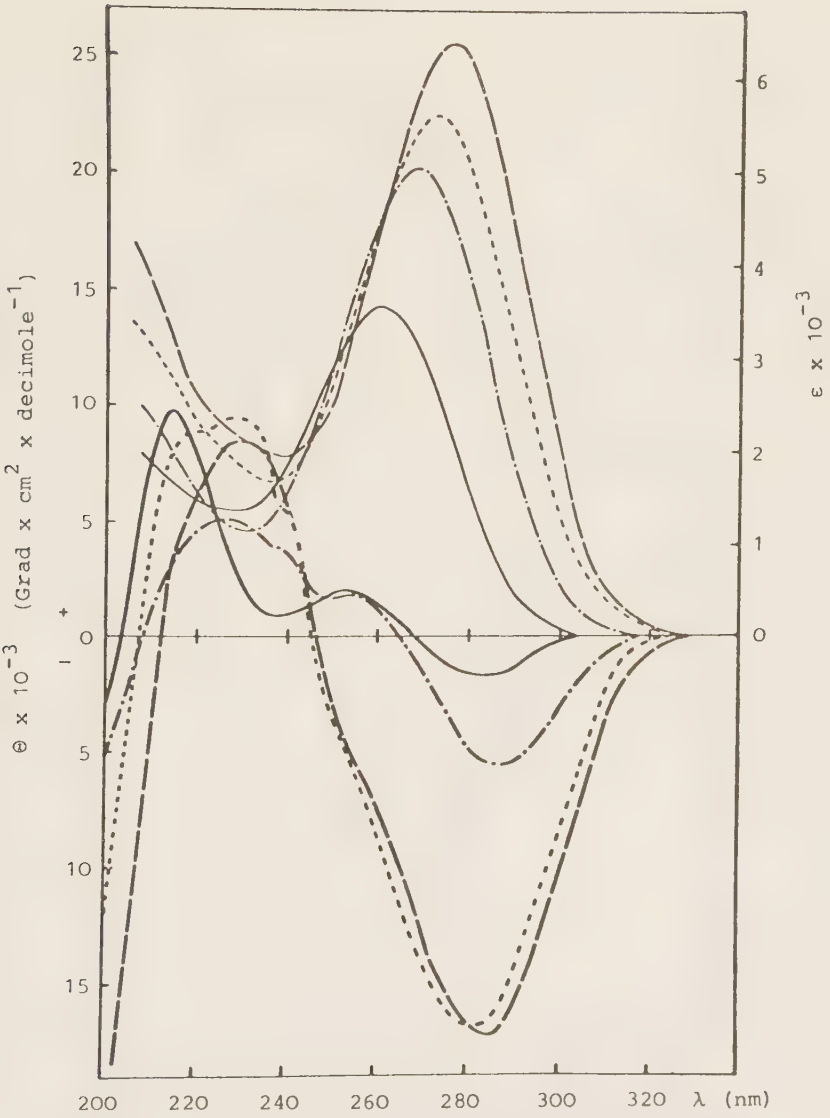


Abb.3o Elektronenspektren von 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylester (UV ——, CD ——), 3-Chlor- (UV ----, CD ----), 3-Brom- (UV — —, CD — —) und 3-Methyl-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylester (UV — · —, CD — · —) in Methanol

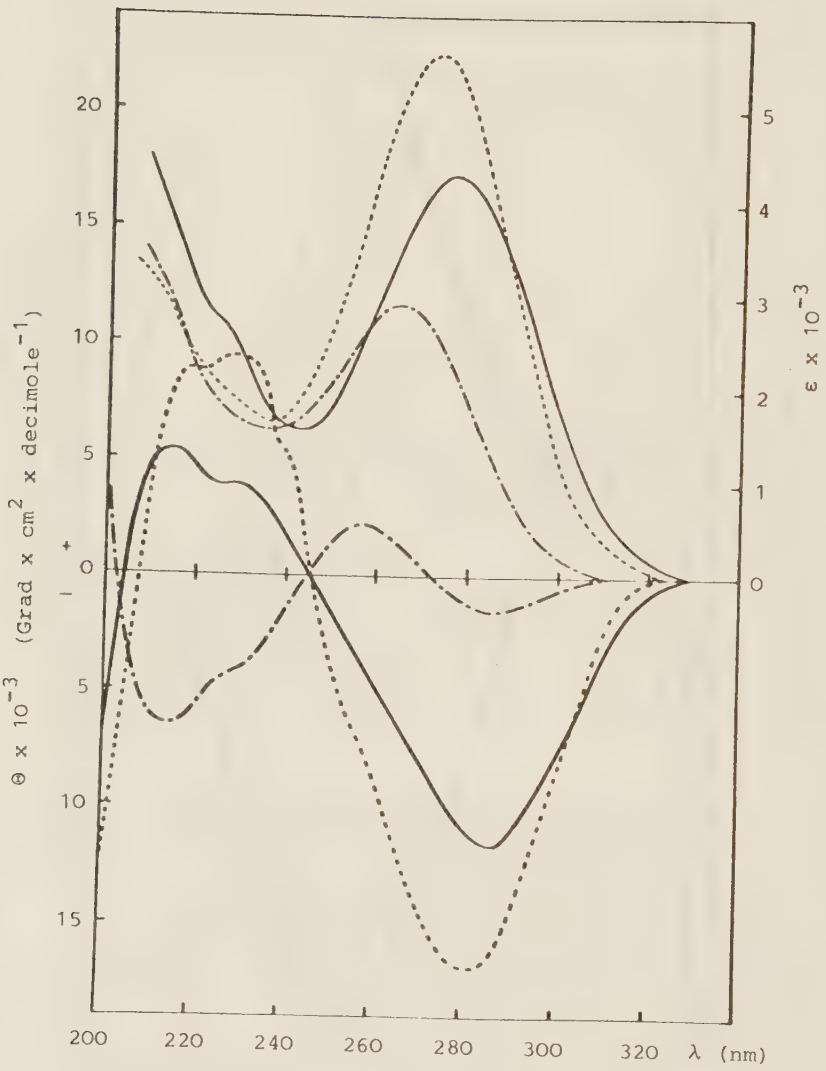


Abb.31 Elektronenspektren von 3-Chlor- (UV ----, CD ----), 5-Chlor- (UV —·—, CD —·—) und 3,5-Dichlor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylester (UV ——, CD ——) in Methanol

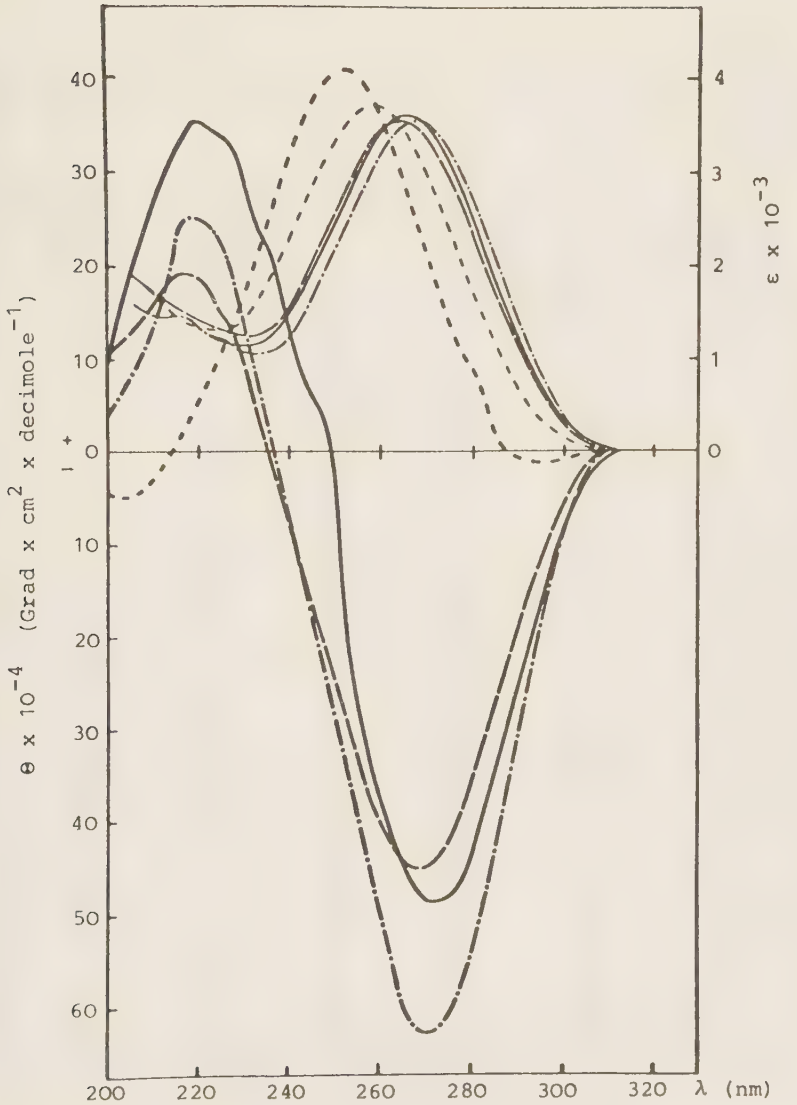


Abb.32 Elektronenspektren der 1,2-Diacetoxyderivate von 3-Fluor- (UV ——, CD —·—), 4-Fluor- (UV — —, CD — —), 5-Fluor- (UV ----, CD ----) und 6-Fluor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylester (UV ——, CD ——) in Methanol

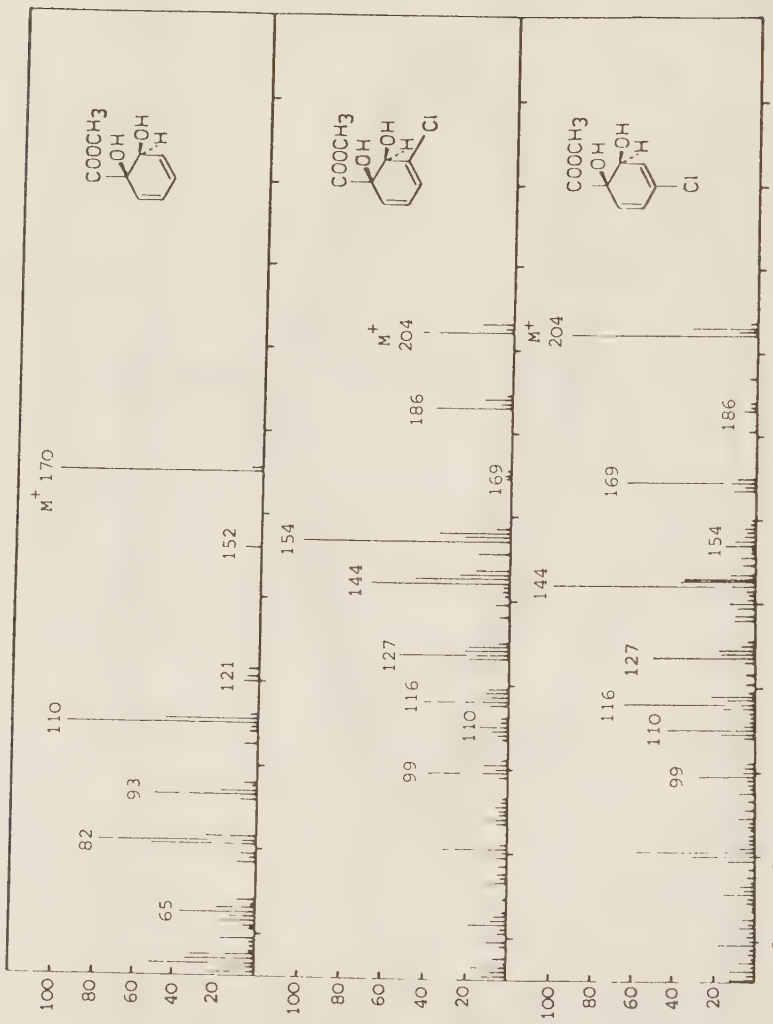


Abb.33 Massenspektrum des (a) 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters
(b) 3-Chlor- (c) 4-Chlor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters

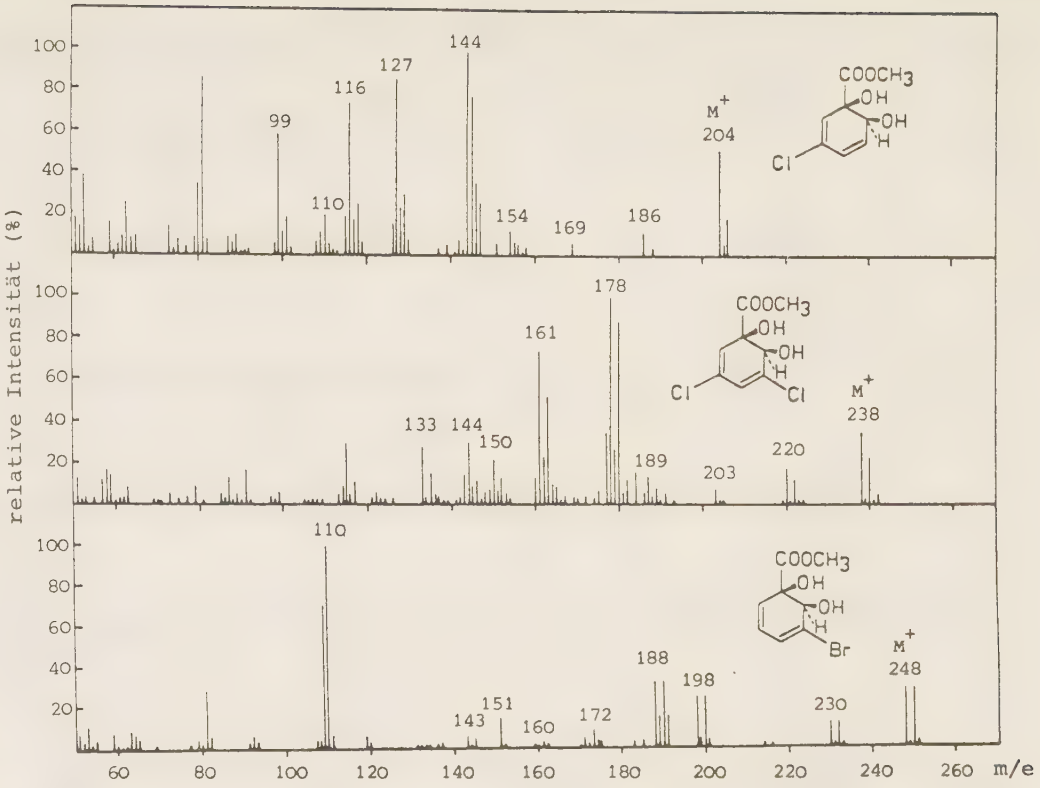


Abb.34 Massenspektrum des (a) 5-Chlor- (b) 3,5-Dichlor- (c) 3-Brom-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters

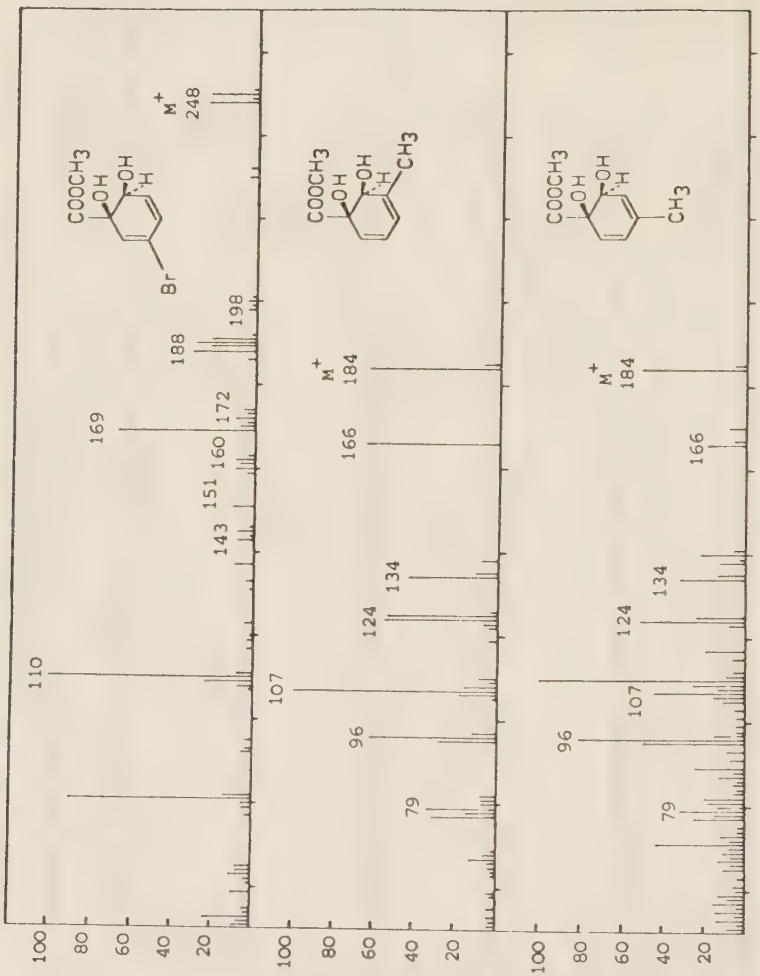


Abb.35 Massenspektrum des (a) 5-Brom- (b) 3-Methyl- (c) 4-Methyl-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters

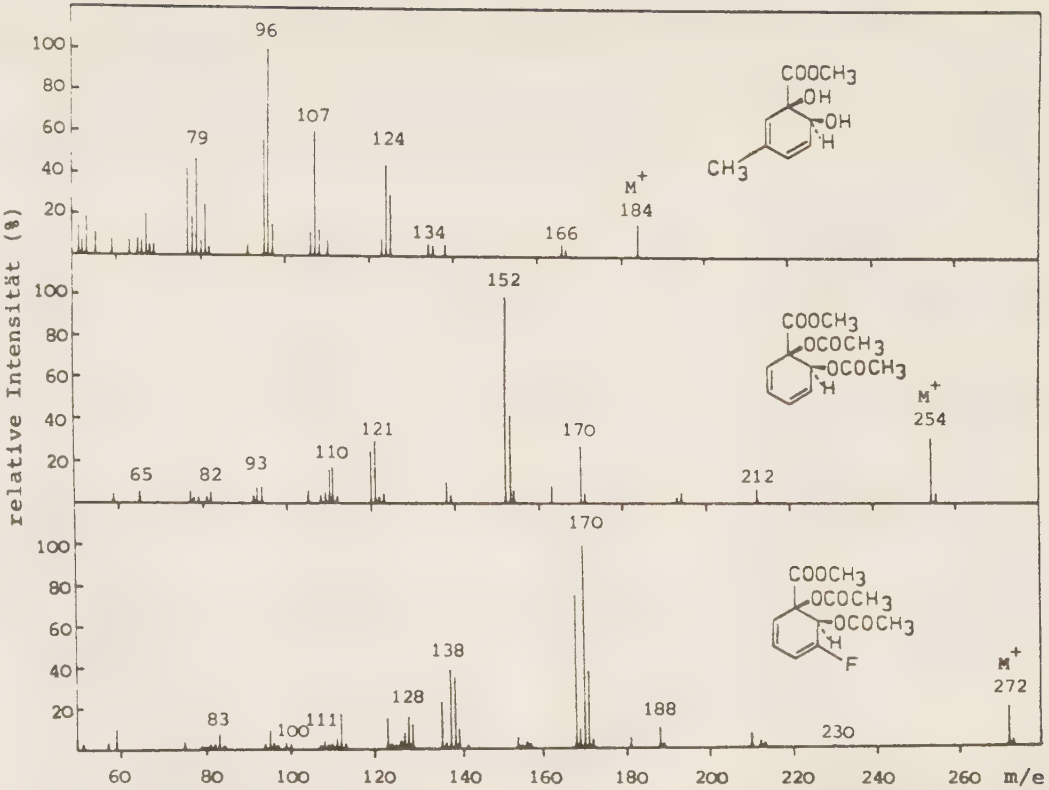


Abb.36 Massenspektrum des (a) 5-Methyl-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters sowie des 1,2-Diacetoxyderivates des (b) 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters (c) 3-Fluor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters

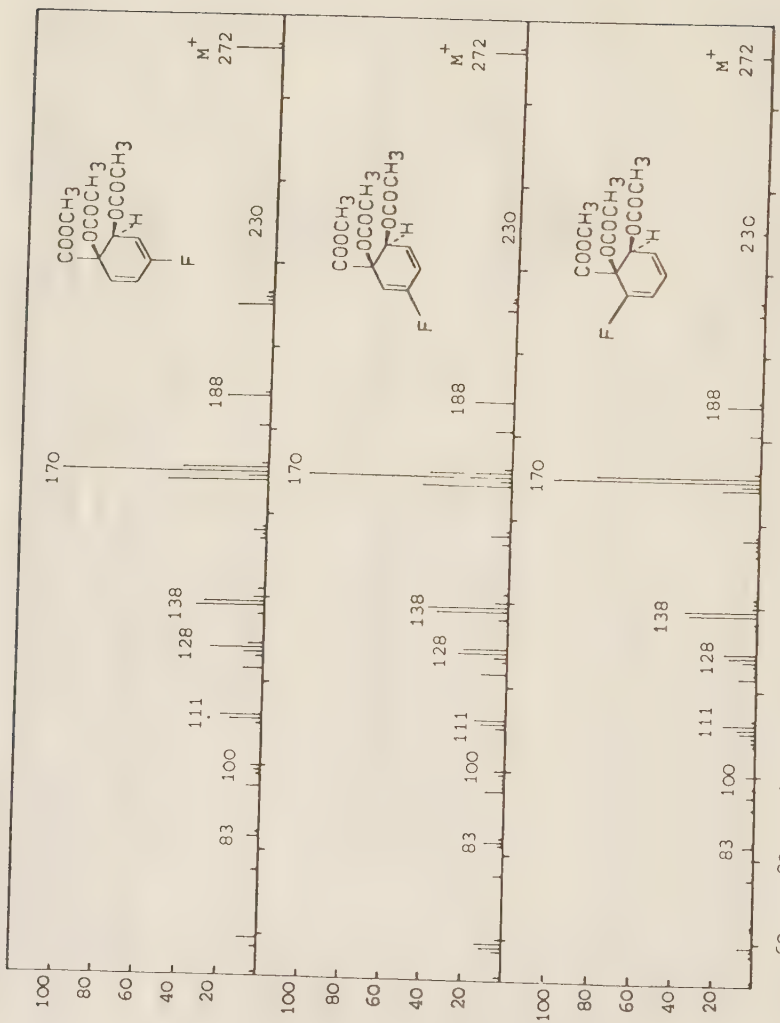


Abb.37 Massenspektrum des 1,2-Diacetoxyderivates des (a) 4-Fluor- (b) 5-Fluor- (c) 6-Fluor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters

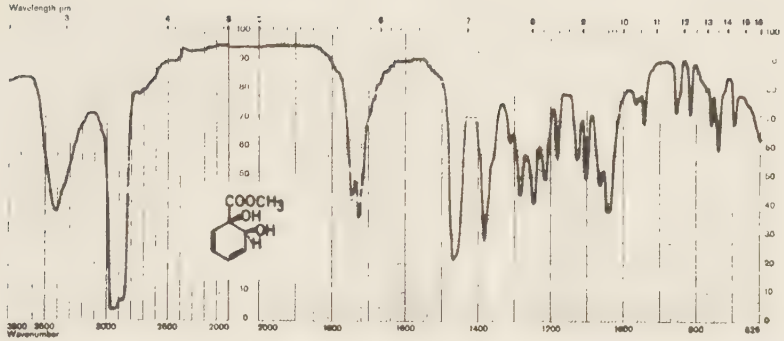


Abb.38 IR-Spektrum des 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in Nujol

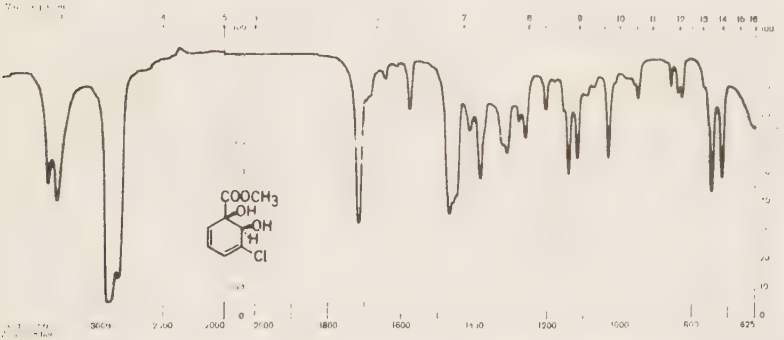


Abb.39 IR-Spektrum des 3-Chlor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in Nujol

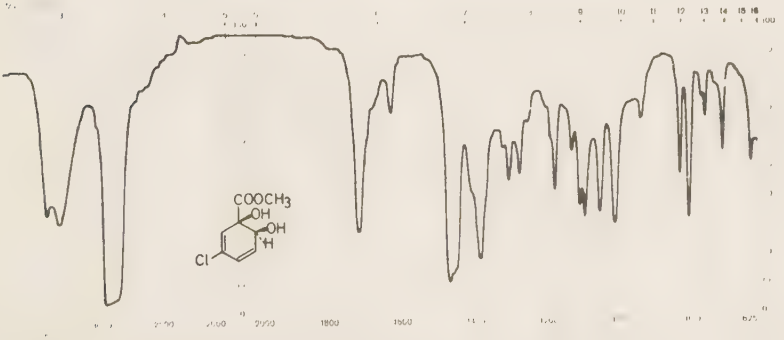


Abb.4o IR-Spektrum des 5-Chlor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in Nujol

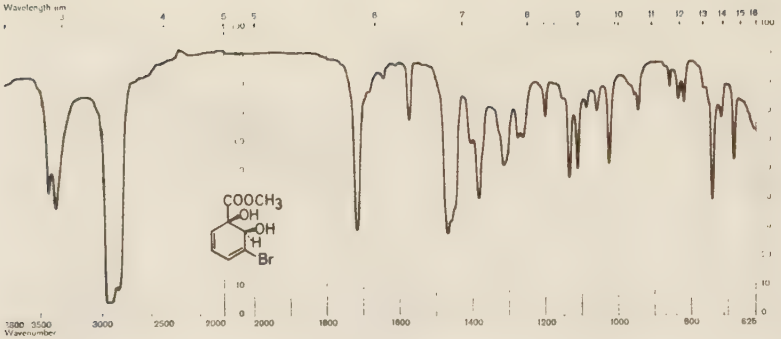


Abb.41 IR-Spektrum des 3-Brom-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in Nujol

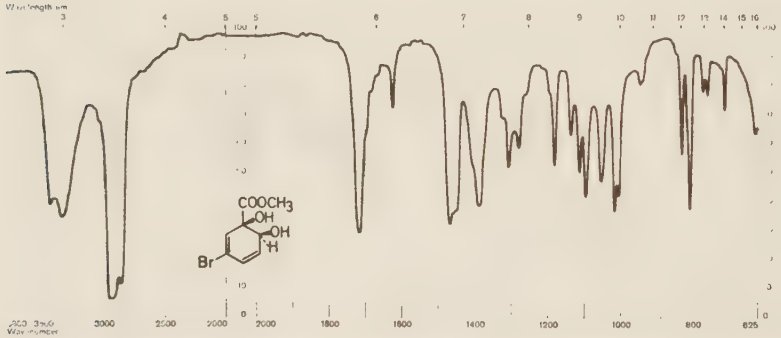


Abb.42 IR-Spektrum des 5-Brom-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in Nujol

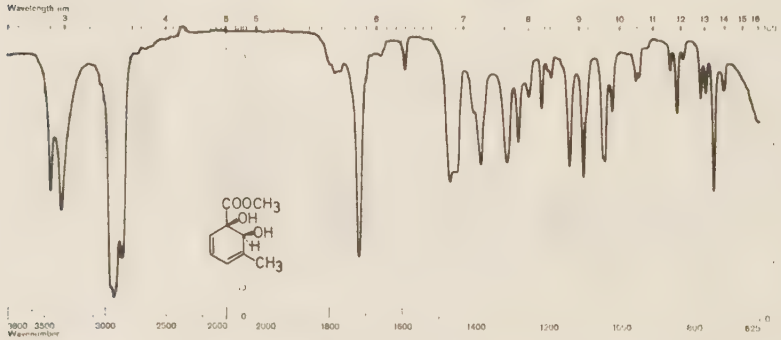


Abb.43 IR-Spektrum des 3-Methyl-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in Nujol

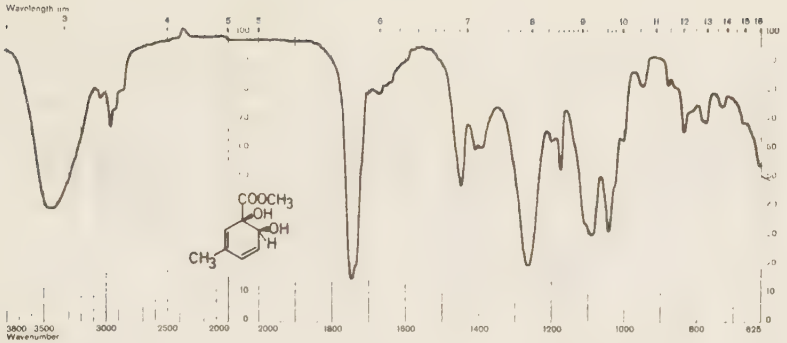


Abb.44 IR-Spektrum des 5-Methyl-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters

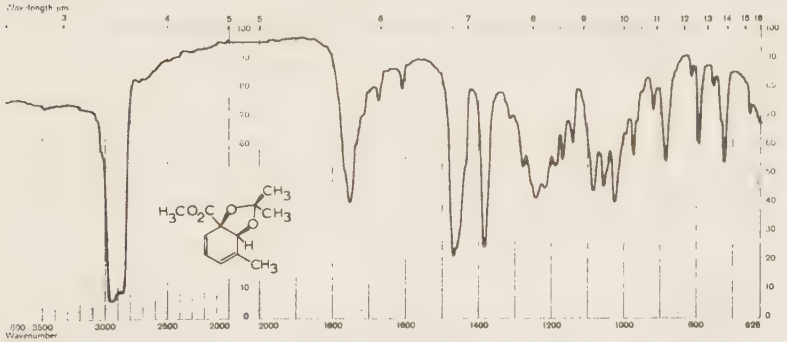


Abb.45 IR-Spektrum des Isopropylidenderivates des 3-Methyl-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in Nujol

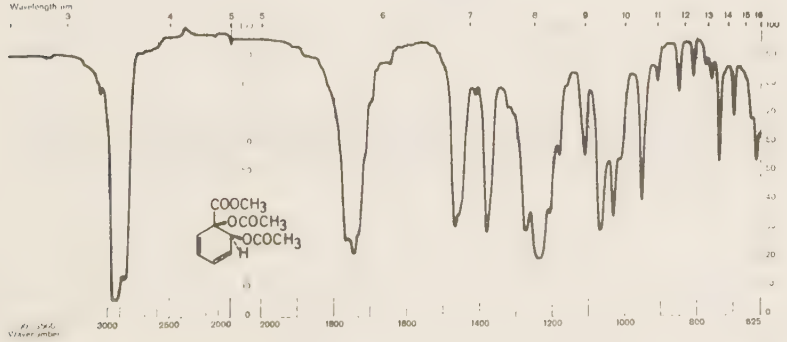


Abb.46 IR-Spektrum des 1,2-Diacetoxyderivates des 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in Nujol

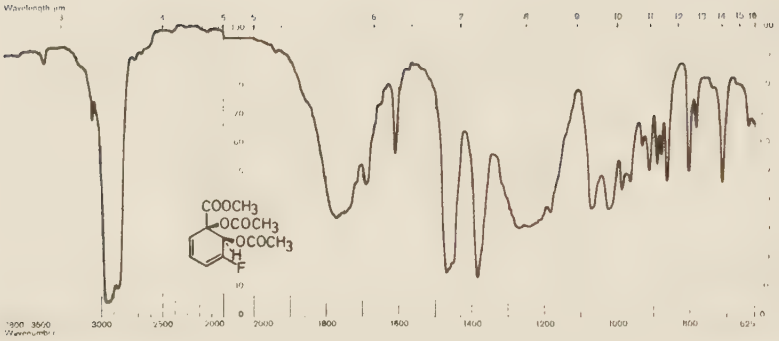


Abb.47 IR-Spektrum des 1,2-Diacetoxyderivates des 3-Fluor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in Nujol

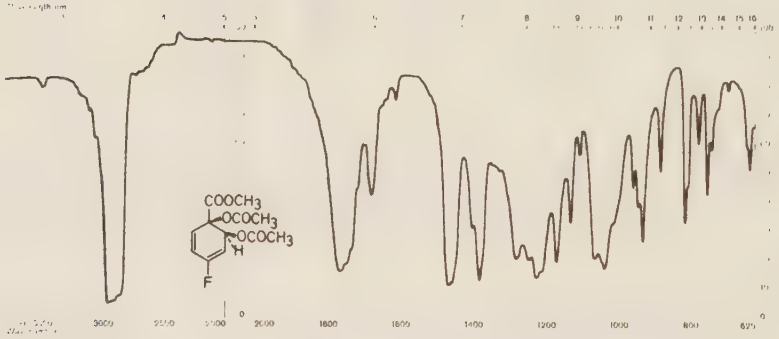


Abb.48 IR-Spektrum des 1,2-Diacetoxyderivates des 4-Fluor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in Nujol

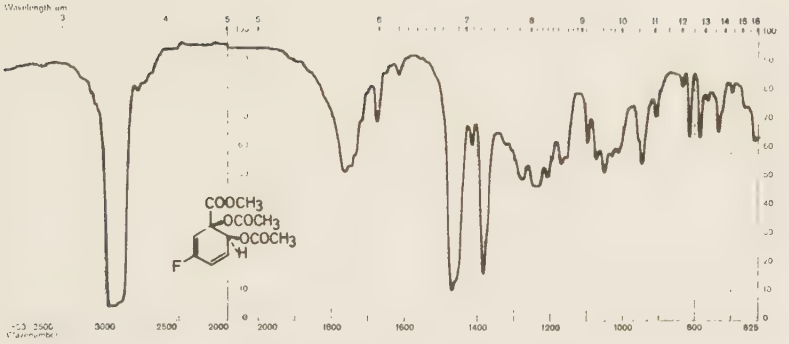


Abb.49 IR-Spektrum des 1,2-Diacetoxyderivates des 5-Fluor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in Nujol

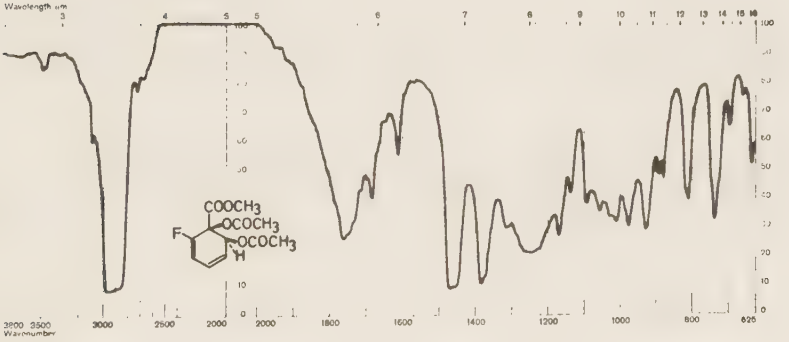


Abb.5o IR-Spektrum des 1,2-Diacetoxyderivates des 6-Fluor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuremethylesters in Nujol

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. H.-J. Knackmuss, danke ich für die Anregungen zu dieser Arbeit, für sein reges Interesse an ihrem Fortgang und für die mir stets gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. W. Otting vom Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Abteilung Chemie, Heidelberg, danke ich für die massenspektroskopischen Untersuchungen, Herrn Prof. Dr. H. Lackner vom Institut für organische Chemie der Universität Göttingen für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Ferner danke ich allen, die mir bei der Anfertigung meiner Arbeit in irgendeiner Weise behilflich waren.

Lebenslauf

Am 1o.4.1948 wurde ich in Lemgo (Kreis Lippe) geboren. Nach der Grundschule besuchte ich das Engelbert-Kämpfer-Gymnasium in Lemgo und legte im November 1966 das Abitur des mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweiges ab. Nach Ableistung des Wehrdienstes studierte ich ein Semester Mathematik und Biologie an der Ruhr-Universität in Bochum. Im Sommersemester 1969 begann ich das Studium der Biologie in Göttingen. Die Diplom-Hauptprüfung für Biologie mit Mikrobiologie als Hauptfach und Chemie und physiologische Chemie als Nebenfächer legte ich im Dezember 1972 ab. Anschließend fertigte ich im Institut für Mikrobiologie meine Diplomarbeit mit dem Thema: "Der Einfluß von Chlorsubstitution auf die Oxigenierung von Benzoat durch Bakterien." Im September 1973 begann ich mit der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation.